ALEXANDRA MARIA BESSA FERREIRA LEITÃO

CITOGENÉTICA DE BIVALVES COM IMPORTÂNCIA COMERCIAL: AS OSTRAS

PORTO

1999

ALEXANDRA MARIA BESSA FERREIRA LEITÃO

CITOGENÉTICA DE BIVALVES COM IMPORTÂNCIA COMERCIAL: AS OSTRAS

DISSERTAÇÃO DE CANDIDATURA AO GRAU DE DOUTOR APRESENTADA AO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR DA UNIVERSIDADE DO PORTO

PORTO

1999

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ PARIS VI

CO-TUTELLE AVEC L'UNIVERSITÉ DE PORTO

Spécialité:

Océanologie biologique

Présentée par

Alexandra LEITÃO

Pour obtenir le grade de DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PARIS VI

Cytogénétique de bivalves avec intérêt commercial: les Huîtres

ICBAS U PORTO BIBLIOTECA

ORIENTADORES DE TESE: Professora Doutora Isabel Malheiro

Doutora Catherine Thiriot

Declaração

De acordo com o disposto no nº2 do artigo 8º do Decreto lei nº 388/70, nesta dissertação foram utilizados resultados das publicações abaixo indicadas. No cumprimento do disposto no referido Decreto-Lei, a autora desta dissertação declara que interveio na concepção e na execução do trabalho experimental, na interpretação dos resultados e na redacção dos manuscritos publicados, aceites para publicação e em preparação, sob o nome de Alexandra Leitão.

Leitão A, Boudry P, Labat JP, e Thiriot-Quiévreux C, (1999). Comparative karyological study of cupped oyster species. Malacologia **41(1)**, 175-186.

Leitão A, Thiriot-Quiévreux C, Boudry P, e Malheiro I, (1999). A "G" – chromosome banding study of three cupped oyster species: *Crassostrea gigas*, *Crassostrea angulata* and *Crassostrea virginica* (Mollusca:Bivalvia). Genetics, Selection and Evolution **31(5/6)**.

Thiriot-Quiévreux C, Leitão A, Boudry P, e Gérard A. Relation between growth and aneuploidy: a survey over ten years. (em preparação).

Agradecimentos

À Doutora Catherine Thiriot por me ter recebido no seu laboratório permitindo a realização deste estudo. Pela sua orientação permanente, disponibilidade e pela inspiração que foi para mim, pelo seu dinamismo e optimismo, como profissional e como pessoa, durante a realização desta tese.

À Professora Doutora Isabel Malheiro por e apesar da distância, ter seguido e orientado sempre de perto o desenvolvimento desta tese. Pela sua grande dimensão humana, tendo sempre uma palavra amiga de encorajamento.

À Professora Doutora Beatriz Porto, pela orientação nos meus primeiros contactos com a citogenética e pelas discussões que sempre me fazem lembrar o porquê de ter escolhido esta área.

Ao Doutor Pierre Boudry e Helen McCombie, pela calorosa hospitalidade aquando das deslocações à estação marinha IFREMER de La Tremblade, e esperando que a colaboração científica iniciada durante esta tese se possa prolongar.

A Jacques Soyer, director do Observatório Oceanológico de Villefranche sur Mer e a Fereidoun Rassoulzadegan, director do Laboratório de Biologia e Ecologia do Plancton Marinho de me terem recebido para a realização desta tese.

A Sami Souissi e Jean Philipe Labat pela ajuda no tratamento estatístico, por terem conseguido tornar a estatística, para mim, um assunto agradável.

A Viviane Thiriot, pela ajuda no tratamento das imagens, por ter trocado, de vez em quando, as suas telas por uma outra "obra de arte": os cromossomas.

André Gerard, Jean Pierre Flasch, Bertrand Collet, Anne Thebault, Serge Heurtebise e todas as pessoas da estação marinha IFREMER La Tremblade, por me terem recebido neste laboratório, demonstrando a sua disponibilidade e simpatia, em cada deslocação minha efectuada àquela estação, para realização do trabalho de tese inserido no programa GENEPHYS.

Raquel Gonçalves, Paula Coelho e Sofia Santos por terem encontrado a disponibilidade de me introduzir na técnica da *hibridação in situ.*

A Jean François Samain e Daniel Sellos, por terem fornecido a sonda com as sequências que codificam para o gene da amílase na espécie *Crassostrea gigas,* utilizada na experiência de *hibridação in situ.*

À embaixada de França em Portugal (programa de cooperação franco-português nº158 C1) e à Comunidade Europeia (através do programa GENEPHYS e da bolsa GT 97-3599) por terem financiado este trabalho.

A Martine Fiorini, Germaine Labat e Patricia Challier, por toda a ajuda na resolução das questões administrativas.

A todos os amigos da estação marinha de Villefranche sur Mer, por terem tornado estes anos de realização da tese, ricos em memórias preciosas, Valérie, Cécile, Salvatore, Maite, Daniel, Fred A, Fred N, Irit, Evelyn, Evelyne, Eric....e especialmente a uma <<MacGiver>> perfeita, que tantas vezes me ajudou a encontrar solução para os pequenos problemas logísticos de todos os dias, obrigada Stephanie.....
.....e àqueles que ficaram no Porto e que fizeram com que cada regresso fosse um recarregar de energia positiva, Catarina, Ana, Bibi, Pi, João, Paulo, Claudia, ...

Catherine Rey, por estar sempre lá quando precisava de uma palavra de encorajamento, ou simplesmente para partilhar as boas coisas. Pelas mil e uma vezes que lhe "aluguei" as orelhas.

E, o mais importante para o fim, aos meus pais e irmãs pelo apoio incondicional, incentivo e paciência durante todos estes anos.

Remerciments

Au Docteur Catherine Thiriot pour m avoir accueilli dans son laboratoire rendant possible la réalisation de cette thèse. Pour son orientation permanente, disponibilité, soutien et pour l' inspiration, enthousiasme et dynamisme tant professionnel que personnel qu' elle m' a apportés pendant cette thèse.

Au Professeur Isabel Malheiro, pour avoir toujours suivi et orienté de près cette thése, même à distance, pour son grand cotê humain, ayant toujours un mot d'encouragement.

Au Professeur Beatriz Porto, pour son orientation dans mes premiers contacts avec la cytogénétique et pour les discussions qui me rappellent toujours pourquoi j'ai choisi ce domaine.

Au Docteur Pierre Boudry et Helen McCombie, pour leur chaleureuse hospitalité dans les déplacements effectués à la Station IFREMER La Tremblade, j'espére que la collaboration scientifique entamée durant cette thése pourra se poursuivre.

Merci aussi à Jacques Soyer, directeur de l'Observatoire Océanologique de Villefranche sur Mer et à Fereidoun Rassoulzadegan, directeur du Laboratoire d'Océanologie Biologique et Ecologie du Plancton Marin d'avoir bien voulu m'accueillir.

À Sami Souissi et Jean Philipe Labat pour leur aide dans le traitement statistique des donnés et pour avoir rendu la statistique, pour moi, un sujet agréable.

À Viviane Thiriot pour tout son aide dans le traitement des images, pour avoir des fois changé ces toiles pour un autre "oeuvre d'art": les chromosomes.

À André Gerard, Jean Pierre Flassch, Bertrand Collet, Anne Thebault, Serge Heurtebise, et tout le personnel de la Station IFREMER La Tremblade, pour m'avoir acueilli dans ce laboratoire, pour leur disponibilité et symphatie à chaque déplacement que j'ai fait à cette station pour la réalisation du travail de thèse inseré dans le programme Européen GENEPHYS.

À Raquel Gonçalves, Paula Coelho e Sofia Santos pour avoir trouvé la disponibilité de m'introduire à la technique de l'hybridation in situ.

À Jean-François Samain et Daniel Sellos, pour avoir fourni la sonde avec les séquences qui codifient pour le gene de l'amylase chez Crassostrea gigas, utilisé dans l'expérience d'hybridation *in situ*.

À l'Ambassade de France au Portugal (programme franco-portugais n° 158 C1) et à la Communauté Européene (à travers le programme GENEPHYS et la bourse GT 97-3599) pour avoir financé ce travail.

À Martine Fiorini, Germaine Labat et Patricia Challier pour toute leur aide dans la résolution des questions administratifs.

À tous les amis de l'Observatoire Océanologique de Villefranche sur Mer pour avoir enrichi ces années de thèse de plein de bons souvenirs: Valérie, Cécile, Salvatore, Maite, Daniel, Fred A, Fred N, Irit, Evelyn, Evelyne, Eric...et un merci spécial à une parfaite <<MacGyver>> qui tant de fois m'a aidé à trouver une solution à des petits casse-tête de tous les jours, merci Stephanie.

et à tous ceux qui sont restés à Porto et qui m'ont transmis à chaque retour un chargement d'énergie positive, Catarina, Ana, Bibi, Pi, João, Paulo, Claudia...

À Catherine Rey, pour avoir été toujours lá quand j'avais besoin d'un mot d'encouragement ou pour partager les bonnes choses, pour toutes les mille et une fois ou j'ai "loué" ses oreilles.

Et, le plus important pour la fin, à mes parents et mes soeurs, pour leur soutien inconditionnel, encouragement et patience durant toutes ces années.

ÍNDICE

	Página
Resumo	1
Introdução geral	5
Capítulo I – Identificação dos cromossomas	9
Introdução	10
Material	17
Métodos	21
1.Cariótipo padrão	21
Acondicionamento dos animais	21
Obtenção das preparações cromossómicas	21
Coloração	23
Observação das lâminas	23
Elaboração do cariótipo	23
2.Cariótipos com marcação cromossómica	26
Regiões dos organizadores nucleolares-NOR	26
Bandas C	26
Bandas G	27
Bandas R	28
Hibridação *in situ*	28
Resultados	31
1.Cariótipo padrão e NOR	31
Ostrea edulis	31
Crassostrea gigas	36
Caso particular, população de Argenton	39
Crassostrea angulata	41
Crassostrea sikamea	41
Crassostrea virginica	44
Crassostrea ariakensis	44
Crassostrea gasar	44
Saccostrea commercialis	46
Crassostrea rhizophorae	46

2. Análise cariológica comparativa..... 48
3. Localização da heterocromatina através do método das bandas C..... 52
Ostrea edulis..... 52
4. Bandas G..... 52
Ostrea edulis..... 54
Crassostrea gigas, *Crassostrea angulata* e *Crassostrea virginica*..... 54
5. Bandas R..... 60
Ostrea edulis..... 60
Crassostrea gigas..... 60
Crassostrea angulata..... 60
Crassostrea virginica..... 60
6.Hibridação *in situ*..... 60
Crassostrea virginica..... 60
Crassostrea gigas..... 60
Discussão..... 67
1. Análise cariométrica..... 67
2. Análise das marcações cromossómicas..... 70
Ag-NORs..... 70
Bandas C..... 72
Localização simultânea das NOR e das bandas C..... 74
Bandas G..... 74
Bandas R..... 75
3. Cromossoma supranumerário da população de Argenton..... 76
Conclusão..... 78
Synthèse I..... 79

Capítulo II – Fenómeno da aneuploidia na espécie *Crassostrea gigas*... 81
Introdução..... 82
Material..... 86
1.Populações criadas no âmbito do programa GENEPHYS..... 86
2.Famílias de "full-sibs"..... 90
3. População controlo..... 90

Métodos 91
1. Obtenção das preparações cromossómicas 91
2. Estimação da aneuploidia 91
3. Tratamento estatístico 92
Resultados 93
1.Estimação da aneuploidia nas populações de GENEPHYS 93
Populações do cruzamento 20x20 93
Populações dos cruzamentos 5x5 95
População de Bouin 97
2. Estudo da aneuploidia na população de controlo de Argenton 99
3. Estudo da eventual transmissão da aneuploidia 101
Tentativa de obtenção de um método não destructivo-biópsia 101
Estudo da aneuploidia nos progenitores método destructivo 105
Estudo da aneuploidia nos descendentes método destructivo 107
4. Estudo da eventual base genética da relação aneuploidia – crescimento 109
Discussão 112
1. Nível de aneuploidia 112
2. Relação aneuploidia – crescimento 114
3. Transmissão da aneuploidia 116
4. Base genética da relação aneuploidia – crescimento 117
Conclusão 118
Synthèse II 119

Capítulo III – Aplicação da identificação dos cromossomas ao estudo do fenómeno da aneuploidia na espécie *Crassostrea gigas* 121

Introdução 122
Material e Métodos 124
Resultados 125
Discussão 127
Conclusão 130
Synthèse III 131

Conclusões gerais e Perspectivas..... 132

Bibliografia..... 136

Anexos..... 149

Resumo

Resumo

Este trabalho tinha como objectivo identificar os cromossomas de várias espécies da família Ostreidae, de forma a precisar a citotaxinomia das ostras e de estudar as anomalias cromossómicas, neste caso a aneuploidia, ao nível populacional da espécie de ostra mais explorada comercialmente, *Crassostrea gigas*.

Os resultados obtidos na identificação dos cromossomas, permitiram-nos estabelecer os cariótipos de *Crassostrea angulata*, *Crassostrea virginica* e *Crassostrea rhizophorae* comparando-os com trabalhos anteriores. Resultados originais foram obtidos no estabelecimento dos cariótipos de *Crassostrea sikamea*, *Crassostrea ariakensis*, *Crassostrea gasar* e *Saccostrea commercialis*, e na localização das NOR em *C. angulata*, *C. sikamea*, *C. virginica*, *C. ariakensis*, *C. gasar*, *C. rhizophorae* e *S. commercialis*. A comparação cariológica das oito espécies de ostras rugosas estudadas colocou em evidência as suas relações citotaxonómicas. A identificação individual de cada par de cromossomas homólogos pela marcação em bandas G, foi obtida nas espécies *C. gigas*, *C. angulata*, e *C. virginica*. A análise comparativa do modelo em bandas G mostrou que três espécies apresentam um modelo próximo. No entanto, as diferenças na marcação dos cromossomas permitem corroborar as diferenças genéticas entre elas.

Os resultados obtidos no estudo do fenómeno da aneuploidia, efectuado em diferentes populações de *Crassostrea gigas* cultivadas no âmbito do programa Europeu GENEPHYS, confirmaram a presença de uma taxa de células aneuploides e a existência de uma correlação negativa entre o fenómeno da aneuploidia e a taxa de crescimento em todas as populações. O estudo da eventual transmissão da aneuploidia, foi efectuado em duas gerações: o carácter hereditário deste fenómeno não pôde ser demonstrado. No entanto, o carácter genético associado á origem geográfica dos progenitores pôde ser sugerido. O estudo da aneuploidia, efectuado em seis famílias de "full-sibs" seleccionadas pelo seu peso no seio das 24 famílias produzidas simultaneamente, permitiu propor um base genética na relação aneuploidia-crescimento.

A técnica de marcação pelas bandas G, foi aplicada a 23 cariótipos aneuploides de *C. gigas*, para identificação dos cromossomas ausentes. As perdas cromossómicas localizaram-se principalmente nos pares 1, 9 e 10.

Résumé

Le but de ce travail a été d'identifier les chromosomes de plusieurs espèces de la famille des Ostreidae a fin de préciser la cytotaxonomie des Huîtres, puis d'étudier des anomalies chromosomiques, ici l'aneuploïdie, au niveau populationnel de l'espèce la plus exploitée au niveau mondial, *Crassostrea gigas*.

Les résultats obtenus dans l'identification des chromosomes nous ont permis d'établir les caryotypes de *Crassostrea angulata, Crassostrea virginica,* et *Crassostrea rhizophorae* en les comparant avec des travaux antérieurs. Des résultats originaux ont été apportés sur l'obtention des caryotypes de *Crassostrea sikamea, Crassostrea ariakensis, Crassostrea gasar* et *Saccostrea commercialis*, et sur la localisation des NORs chez *C. angulata, C. sikamea, C. virginica, C. ariakensis, C. gasar, C. rhizophorae et S. commercialis*. La comparaison caryologique des huit especes d'huîtres creuses a mis en évidence leurs relations cytotaxonomiques. L'identification individuelle de chaque paire de chromosomes par le marquage en bandes G a été obtenu chez *C. gigas, C. angulata* et *C. virginica*. L'analyse comparée des modèles de bandes G a montré que les principales bandes G présentaient un modèle très proche, chez ces trois espèces. Cependant, des différences dans les marquages de certaines bandes de chromosomes corroborent les divergences génétiques entre ces trois espèces.

Les résultats obtenus sur le phénomène d'aneuploïdie, étudié dans différentes populations de *Crassostrea gigas* cultivées dans le cadre du programme Européen GENEPHYS, ont confirmé la présence d'un taux de cellules aneuploïdes et l'existence d'une corrélation négative aneuploïdie-croissance dans toutes les populations. L'étude de la transmission éventuelle de l'aneuploïdie a été suivie sur deux générations: le caractère héréditaire de ce phénomène n'a pu être démontré, par contre, le caractère génétique associé à l'origine géographique des parents a étè suggéré. L'étude de l'aneuploïdie effectuée dans six familles de jumeaux, sélectionnées pour leur poids extrême ou intermédiaire au sein de l'ensemble de 24 familles de jumeaux produites simultanement, a permis de proposer une base génétique de la relation aneuploïdie-croissance.

L'application du marquage en bandes G a été effectée sur 23 caryotypes aneuploïdes de *C. gigas*, pour l'identification des chromosomes absentes. Les pertes chromosomiques sont localisées principalement sur les paires 1, 9 et 10.

Abstract

The aim of this work was to identify the chromosomes of several species of the Ostreidae family, in order to precise the oysters cytotaxonomy and of studying chromosomal abnormalities, in this case the aneuploidy phenomenom, on a population level on the species most explored at the comercial level, *Crassostrea gigas*.

The results obtained through the identification of chromosomes allowed the establishement of the karyotypes of *Crassostrea angulata*, *Crassostrea virginica* and *Crassostrea rhizophorae* and the comparaison with previous studies. Original results were obtained through the establishement of the karyotypes of *Crassostrea sikamea*, *Crassostrea ariakensis*, *Crassostrea gasar* and *Saccostrea commercialis*, and on the NOR location in *C. angulata*, *C. sikamea*, *C. virginica*, *C. ariakensis*, *C. gasar*, *C. rhizophorae* and *S. commercialis*. The comparative caryological analysis of the eight cupped oysters put in evidence their cytotaxonomic relationships. The individual identification of each pair of chromosomes by the tagging with the G-banding method, was obtained in the species *C. gigas*, *C. angulata* and *C. virginica*. The comparative analysis of the G-band model showed that the main G bands presented a similar pattern, in these three species. However, the differences in the pattern of some of those bands in some chromosomes, corroborate the genetic differences between them.

The results obtained on the study of the aneuploidy phenomenon in different populations of *Crassostrea gigas*, raised in the context of the European programm GENEPHYS, have confirmed the presence of a rate of aneuploid cells and the existence of a negative correlation between somatic aneuploidy and growth in all those populations. The study of the eventual transmission of the aneuploidy was performed in two successive generations: the hereditary character of this phenomenon could not be demonstrated. However, the genetic character associated to the geographic origin of the parents has been suggested. The study of the aneuploidy performed in six full-sibs families, selected by their weight on the group of 24 families produced simultaneously, allowed us to propose a genetic base for the aneuploidy–growth relationship.

The application of the G- bandins method was performed in 23 aneuploid karyotypes of *C. gigas*, to identify the missing chromosomes. The chromosomic losses were located preferentially in pairs n° 1, 9 and 10.

Introdução geral

Introdução geral

As ostras são um grupo de moluscos bivalves com uma grande diversidade de espécies e com uma ampla distribuição geográfica.

O estatuto taxonómico das várias espécies de ostras é ainda ambíguo. Inicialmente, a taxinomia destes animais era feita com base em critérios zoológicos como a descrição e comparação de características anatómicas, morfológicas, fisiológicas e de etiologia.

Estudos recentes de genética molecular (Littlewood, 1994) permitiram clarificar a taxinomia de algumas espécies de ostras e de estabelecer com precisão as relações filogenéticas entre elas.

A citogenética pode igualmente ser útil na identificação das diferentes espécies de ostras e na realização de análises comparativas interespecíficas, através do estudo dos respectivos cariótipos. O cariótipo define o número, o tamanho e a morfologia dos cromossomas de uma espécie (Blaxhall, 1983) e é característico dessa espécie.

Até ao momento, foram estudadas, por técnicas de citogenética 22 espécies de ostras (Ieyama, 1990). A maior parte desses estudos referiram-se inicialmente apenas ao número cromossómico e morfologia (*e.g.* Longwell *et al.*, 1967; Ahmed, 1973), e posteriormente à análise morfométrica de cariótipos padrão (*e.g.* Rodriguez-Romero *et al.*, 1978; Thiriot-Quiévreux, 1984; Ladron de Guevara *et al.*, 1996). Estes estudos colocaram em evidência que, na família Ostreidae, a maior parte das espécies apresentam um número diploide de 20 cromossomas e cariótipos constituídos essencialmente por pares de cromossomas metacêntricos e submetacêntricos.

Até hoje, foram efectuadas neste grupo, poucas aplicações de técnicas de marcação que permitam a identificação cromossómica. Estas disseram respeito, quase exclusivamente, à aplicação de técnicas de coloração diferencial, como a técnica de coloração argêntea para as regiões dos organizadores nucleolares, Ag-NORs, ou a técnica das bandas C para a localização da heterocromatina constitutiva (Insua e Thiriot-Quiévreux, 1993; Li e Havenhad, 1997), a algumas espécies de ostras do género *Ostrea*.

É pois de interesse aplicar as técnicas de marcação cromossómica a um maior número de espécies, em particular do género *Crassostrea* ao qual pertencem a maior parte das espécies com interesse comercial.

A obtenção de um conhecimento preciso da constituição do cariótipo poderá servir como utensílio no estabelecimento da citotaxonomia neste grupo de animais. De facto os parâmetros citogenéticos podem ser muito úteis na investigação dos processos evolutivos e de especiação (Dutrillaux e Couturier, 1983).

Devido à grande importância comercial de várias das suas espécies, as ostras são muito exploradas comercialmente, quer através da recolha do meio natural quer da produção em aquacultura.

A produção da ostra do pacífico *Crassostrea gigas* foi estimada em 3.106 toneladas de acordo com os dados da FAO (1997), o que equivale a mais de 95% da produção total de ostras mundial. Existem, no entanto, outras espécies que apresentam igualmente um grande interesse comercial tais como a ostra americana *Crassostrea virginica,* a ostra portuguesa *Crassostrea angulata* ou a ostra chata (plana) *Ostrea edulis*. Vários estudos têm sido efectuados para melhoria destas espécies, sobretudo no que se refere às características com interesse comercial, tais como a resistência às doenças e a taxa de crescimento. De facto, a variabilidade desta ultima é um dos maiores problemas enfrentados pelos ostreícultores. Esta variabilidade pode ser considerável, mesmo entre indivíduos com a mesma idade e criados nas mesmas condições (*e.g.* Mallet e Halley, 1984).

Vários factores têm sido associados à taxa de crescimento nos bivalves, as características do seu meio ambiente e nutricionais (*e.g.* Utting, 1986), o acondicionamento dos genitores (*e.g.* Gallager e Mann, 1986) e os parâmetros genéticos (e.g. Newkirk, 1980; Zouros e Foltz, 1987).

Uma correlação negativa entre a taxa de crescimento e o nível de aneuploidia somática (hipodiploidia, *i.e.* ausência de um ou dos dois cromossomas num par de homólogos), foi posta em evidência na espécie *Crassostrea gigas* (*e.g.* Thiriot-Quiévreux *et al.*, 1988).

A obtenção de um melhor conhecimento desta relação, sobretudo no que diz respeito à existência de bases genética e hereditária, poderá contribuir para o melhoramento das condições de cultura desta espécie e de todas as espécies de ostras em geral.

Os **objectivos** deste trabalho foram:

- identificar os cromossomas de várias espécies da família Ostreidae, de forma a precisar a citotaxinomia das ostras;

- estudar as anomalias cromossómicas, neste caso a aneuploidia, ao nível populacional da espécie mais explorada a nível mundial, *Crassostrea gigas*;

- efectuar a identificação dos cromossomas ausentes nos cariótipos aneuploides de *Crassostrea gigas.*

Assim esta tese encontra-se estruturada em três capítulos:

Capítulo I- será consagrado à identificação dos cromossomas. Nele constará: o cariótipo padrão executado para nove espécies de ostras com interesse comercial, de diversas origens geográfica; a identificação de pares cromossómicos específicos efectuada através da aplicação de técnicas de coloração diferencial, como as técnicas de coloração para as regiões dos organizadores nucleolares, da heterocromatina e a técnica de hibridação *in situ*; a caracterização individual de todos os pares cromossómicos, através das técnicas de coloração pelas bandas G e R.

Capítulo II- será dedicado ao estudo do fenómeno da aneuploidia na espécie *Crassostrea gigas.* Nele constará: o estudo da aneuploidia efectuado em várias populações desta espécie, no âmbito de um programa europeu GENEPHYS ("Genetical bases and variability of physiological traits involved in growth in Crassostrea gigas"), incidindo sobre a relação aneuploidia–crescimento, e na averiguação da existência de bases genéticas nesta relação.

Capítulo III- apresentará os primeiros resultados da aplicação da identificação dos cromossomas ao fenómeno da aneuploidia. Para tal será efectuada a identificação individual dos cromossomas, através da técnica bandas G (Capítulo I), para clarificar o fenómeno da aneuploidia (Capítulo II). De facto, para se poder obter uma melhor compreensão do fenómeno da aneuploidia, é importante determinar qual o ou os cromossomas ausentes em cariótipos aneuploides.

Capítulo I

Identificação dos cromossomas

Introdução

Os primeiros estudos de citogenética efectuados em ostras, disseram respeito apenas ao número cromossómico (Longwell *et al.*, 1967; Ahmed 1973). Posteriormente, a análise morfométrica dos cariótipos permitiu a caracterização morfológica dos cromossomas com base na posição do centrómero (*e.g.* Rodriguez-Romero *et al.*, 1978; Thiriot-Quiévreux, 1984; Ieyama, 1990; Ladron de Guevara *et al.*, 1996). Estes estudos mostraram que, na família Ostreidae, os cariótipos são simétricos, apresentando quase todas as espécies 2n=20 cromossomas, excepto a espécie *Dendostrea folium* (Ieyama, 1990). As diferenças interespecíficas dizem respeito essencialmente à ocorrência de cromossomas metacêntricos e submetacêntricos e às diferentes proporções destes (Quadro 1). Foram também observadas, diferenças cariotipicas numa mesma espécie (ex: *Crassostrea virginica* e *Crassostrea rhizophorae*). Estas podem ser explicadas pela presença de heteromorfismos intraespecíficos ou por diferenças nas técnicas utilizadas para obtenção dos cariótipos. As várias espécies de ostras podem ter-se diferenciado a partir de inversões pericêntricas ou mudanças cêntricas.

A comparação citotaxonomica deve sempre ser efectuada, tendo por base uma análise cariométrica realizada com a mesma técnica e efectuada pela mesma pessoa. A concentração, o tempo de incubação na colquicina e o tratamento hipotónico, por exemplo, são factores que podem influenciar os resultados, no que diz respeito a diferentes graus de condensação ou elongação dos cromossomas (Sharma e Sharma, 1980). A aplicação de técnicas de coloração diferencial, a técnica de coloração argêntica para as regiões dos organizadores nucleolares (Ag-NORs) e a técnica das bandas C para a heterocromatina constitutiva, têm vindo a permitir a identificação de pares cromossómicos específicos nos cariótipos das ostras. Estas técnicas permitem assim avançar na investigação citogenética das espécies em estudo.

As **regiões** dos **organizadores nucleolares** ou **NORs** correspondem às regiões dos cromossomas que contém os genes que codificam as sub-unidades 18S e 28S do rRNA (Verma, 1983a; Sumner, 1990). A utilização de métodos de coloração por precipitação argêntica amoniacal para detecção, nas metafases, dos locais cromóssomicos onde se situam as NORs (Howell *et al.*, 1975; Goodpasture e

Bloom, 1975), mostrou ser um utensílio citotaxonómico importante, permitindo o estudo comparativo das variações intra e inter específicas das NORs (Amemiya e Gold, 1990).

Quadro 1- Dados cromossómicos sobre as várias espécies de ostras estudadas até ao momento

Espécies	2n	Cariótipo	Origem	Autores
Crassostrea				
C. amasa (Iredale)	20		Australia	Menzel, 1968
C.angulata (Lamarck)	20		Portugal	Menzel, 1968
	20	10m*	France (Barfleur)	Thiriot-Quiévreux, 1984
C. belcheria (Sowerby)	20	10 m-sm	Japão	Ieyama & Inaba, 1974
C. corteziensis (Hertlein)	20	7m-3sm*	Mexico	Rodriguez-Romero & al, 1979a
C. gigas (Thunberg)	20	8m-2sm	E.U.A	Ahmed & Sparks, 1967
	20	10m*	France (Barfleur)	Thiriot-Quiévreux, 1984
C. glomerata Gould	20		Oeste paquistanês	Ahmed, 1973
C. gryphoides (Scholteim)	20		Oeste paquistanês	Ahmed, 1973
C. iredalei (Faustino)	20		Filipinas	Menzel, 1968
C. rhizophorae (Guilding)	20	5m-5sm*	Mexico	Rodriguez-Romero & al, 1979b
	20	8m-2sm*	Venezuela	Marquez, 1992
C. "rivularis (Gould)"	20		Oeste paquistanês	Ahmed, 1973
Sin.*C. ariakensis* (Fujita)	20	10m-sm	Japão	Ieyama, 1975
C. sikamea (Amemiya) (variedade Kumamoto de *C. gigas)*	20		Oeste paquistanês	Ahmed, 1973
C. virginica (Gmelin)	20	6m-4sm*	Costa este dos E.U A	Longwell & al, 1967
	20	6m-4sm*	Mexico	Rodriguez-Romero & al, 1978
	20	6m-4sm*	Venezuela	Marquez, 1992
Saccostrea				
S. commercialis (Iredale & Roughley)	20		Australia	Menzel, 1968
S. cucullata (Born)	20	10m*	India	Goswami, 1992
*S. echinata (*Quoy & Gaimard	20	10m-sm	Japão	Ieyama & Inaba, 1974
*S. mordax (*Gould)	20	10m-sm	Japão	Ieyama & Inaba, 1974
Ostrea				
O. edulis Linné	20	5m-4sm-1st*	França (Barfleur)	Thiriot-Quiévreux, 1984c
	20	5m-4sm-1st*	França (Quiberon)	Thiriot-Quiévreux, 1984c
	20	5m-5sm*	França (Loumergat)	Thiriot-Quiévreux, 1984c
O.denselamellosa Linschke	20	7m-3sm*	França (La Tremblade)	Insua & Thiriot-Quiévreux, 1991
O. puelchana Orbigny	20	4m-5sm-1t*	França (Ronce les bains)	Insua & Thiriot-Quiévreux, 1992
O. angasi Sowerby	20	5m-3sm-2st*	Australia	Li & Havenhand, 1997
Tiostrea				
T. chilensis (Philippi)	20	7m-3sm*	Chile	Ladron de Guevara & al, 1994
Dendostrea				
Dendostrea folium (Lophinae)	*18*	5m-2st-2t*	Japão	Ieyama, 1990

2n: número diploide; *após medições cromosómicas, m - metacêntrico; sm - submetacêntrico; st –subtelocêntrico

Embora se tenham encontrado, na maior parte das espécies estudadas, heteromorfismos no tamanho relativo das NORs em cromossomas homólogos e no

número de NORs activas por célula (Schwarzacher *et al.*, 1978; Howell e Black, 1980; Schwarzacher e Wachtler, 1983; Malheiro, 1989), cada espécie parece ter um número máximo característico de pares de cromossomas com NORs (Howell e Black, 1980). Os heteromorfismos foram detectados por técnicas de coloração argêntea que coram selectivamente as NORs (Howell e Denton, 1974; Goodpasture e Bloom, 1975; Howell *et al.*, 1975; Bloom e Goodpasture, 1976; Ferraro *et al.*, 1977). Foi demonstrado que estas técnicas se fundamentam na redução da prata por proteínas não histónicas (ácidas) (Miller *et al.*, 1976; Schwarzacher *et al.*, 1978; Schwarzacher e Wachtler, 1983) que se encontram na vizinhança dos genes ribossomais (Hubell *et al.*, 1979; Angelier *et al.*, 1982; Hernandez-Verdun *et al.*, 1984; Babu e Verma, 1985; Matsui *et al.*, 1986), e na sua deposição no local das NORs.

Em certas espécie, as NORs situam-se nas mesmas regiões cromossómicas que as constrições secundárias (Tantravahi *et al.*, 1976), mas nem toda constrição secundária corresponde a uma NOR.

Nos bivalves, esta técnica foi utilizada na espécie *Cerastoderme glaucum* (Thiriot-Quiévreux e Wolowicz, 1996) e no género *Mytillus* (Dixon *et al.*, 1986; Dixon e MacFadzen, 1987; Martinez-Exposito *et al.*, 1994, 1997; Insua *et al.*, 1994; Martinez-Lage *et al.*, 1995, 1997). Até ao momento, os padrões das NORs foram estabelecidos apenas em 6 espécies de ostras: *Crassostrea gigas* (Thiriot-Quiévreux e Insua, 1992), *Ostrea edulis* (Thiriot-Quiévreux e Insua, 1992), *Ostrea denselamellosa* (Insua e Thiriot-Quiévreux, 1991; Thiriot-Quiévreux e Insua, 1992), *Ostrea puelchana* (Insua e Thiriot-Quiévreux, 1993), *Ostrea angasi* (Li e Havenhand, 1997) e *Tiostrea chilensis* (Ladron de Guevara *et al.*, 1994). A localização das NORs nos cariótipos de um maior número de espécies de ostras, particularmente no género *Crassostrea,* poderá ser útil no estabelecimento de relações filogenéticas neste grupo de animais.

A **heterocromatina** é constituida por DNA altamente repetitivo e não codificante, na maior parte dos casos (Verma, 1988). De facto, existem espécies como a *Drosophila sp.*, onde é possível associar genes activos a estas regiões (Coelho, 1997).

A presença de heterocromatina na maior parte das espécies conduziu a várias tentativas para determinar as funções destas regiões dos cromossomas. Muitas das funções propostas necessitam ainda de ser confirmadas. No entanto, algumas encontram-se já bem definidas. Segundo Miklos e John (1979), a heterocromatina tem

um papel: (I) na organização cromossómica, procedendo à estabilização dos centrómeros e dos telómeros, (II) no metabolisto celular, controlando a transferência de substâncias para a membrana, (III) no emparelhamento cromossómico, regulando o "crossing over" e a formação de quiasmas, (IV) na especiação e na evolução, afectando a quebra ou rearranjo cromossómico, facilitando a evolução dos cariótipos. Este tipo de cromatina pode ser posta em evidência pela técnica das bandas C (Sumner, 1972). Estas bandas são assim designadas por terem sido visualizadas, pela primeira vez, na região centromérica dos mamíferos.

A **técnica das bandas C** põe em evidência as bandas que correspondem a hetrocromatina constitutiva, embora haja heterocromatina que não é marcada por este método. Com efeito, existem casos em que não há uma correspondência completa entre as bandas C e a heterocromatina definida por outros critérios. No entanto, é geralmente aceite que a heterocromatina corresponde áquela que é marcada pelas bandas C (Sumner, 1990). Esta técnica põe em evidência o facto da heterocromatina poder sofrer variações quantitativas e qualitativas , bem como mudanças na sua posição intra e inter específica (John, 1988). Estas características tornam as bandas C úteis como marcadores para comparações intra e inter específicas de cariótipos.

A técnica das bandas C utilizada neste estudo descrita por Sumner em 1972, é utilizada por rotina no estudo dos cromossomas de mamíferos. Existem, no entanto, ainda poucos resultados positivos na aplicação desta técnica aos moluscos (*e.g.* Babrakzaio e Miller, 1984; Dixon e MacFadzen, 1987; Martinez-Lage *et al.*, 1994, 1995; Pasantes *et al.*, 1996).

Nas ostras as bandas C foram, até ao momento, obtidas em apenas duas espécies do género *Ostrea*: *O.denselamellosa* (Insua e Thirot Quiévreux, 1991) e *O. angasi* (Li e Havenhad, 1997).

Técnicas mais recentes, como a coloração com fluorocromos e tratamento com endonucleases, têm sido utilizadas noutras espécies de bivalves (Martinez-Lage *et al.*, 1994, 1995).

Outro método de citogenética molecular actualmente utilizado é a **hibridação "in situ"** que permite visualizar os locais de hibridação de sequências conhecidas de RNA ou de DNA (sondas) em cromossomas ou em cortes de células ou tecidos. Esta técnica tem como fundamento a formação de um hibrido DNA/DNA ou DNA/RNA, o

que é possível se as duas cadeias forem completamente ou parcialmente complementares e que as duas moléculas a hibridar tenham sido desnaturadas previamente, isto é, se encontrem em cadeia simples (Hayes e Dutrillaux, 1998).

Esta técnica foi inicialmente descrita por Pardue e Gall (1969), os quais utilizaram sondas marcadas de RNA ribossomal 18+28S para detectar os genes que codificam para estas moléculas no núcleolo de *Xenopus laevis*. No inicio, a autoradiografia era o único meio de detectar as sondas que eram marcadas radioactivamente. Actualmente, embora se continue a usar sondas radioactivas, sempre que possível estas são substituídas pelas não radioactivas ou isotópicas.

A utilização desta técnica é actualmente muito difundida, tendo sido já efectuados vários ensaios nos vertebrados inferiores, como nos peixes (Fontana *et al.*, 1988; Rossi *et al.*, 1996).

Nos bivalves, a aplicação desta técnica foi efectuada nas espécies *Mytillus galloprovincialis* (Martinez-Exposito *et al.*, 1997) e *Acquipecten opercularis* (Insua *et al.*, 1998).

Nas ostras, esta técnica só foi aplicada, até ao momento, na espécie *Crassostrea gigas*, para a localização de sequências de DNA satélite (Clabby *et al.*, 1996) e de sequências teloméricas específicas (Guo e Allen, 1997).

A informação obtida a partir da aplicação das técnicas de coloração diferencial acima descritas permite um conhecimento mais preciso dos cariótipos das diversas espécies de ostras. No entanto, não é suficiente para a identificação individual de todos os pares de cromossomas homólogos.

As **bandas G** podem ser definidas como um sistema de bandas claras e escuras, alternando ao longo do cromossoma (Sumner, 1990). Mesmo após anos de investigação, o significado funcional e o mecanismo molecular das bandas G ainda não são totalmente conhecidos (Sumner, 1994).

A aplicação da técnica de marcação pelas bandas G aos cromossomas de uma espécie permite a identificação individual de todos os pares de cromossomas e, consequentemente, a elaboração precisa dos respectivos cariótipos. Este conhecimento é essencial para que se possa inferir sobre a separação taxonómica de espécies relacionadas e de determinar a sua evolução.

Esta técnica é utilizada por rotina em citogenética de vertebrados, principalmente em mamíferos (*e.g.* Stanyon *et al.*, 1983; Iannuzzi *et al.*, 1994, 1996; Vassart *et al.*, 1995). Poucos estudos foram efectuados até ao momento em vertebrados inferiores, como nos peixes (*e.g* Blaxhall, 1983; Gold e Li, 1991, 1994; Luo, 1999) e em invertebrados, como nos insectos (*e.g.* Bregman, 1975; Staiber, 1991; Lorite *et al.*, 1996).

Nos bivalves, as tentativas de obtenção de um padrão de bandas G foram efectuadas no género *Mytilus* (Mendez *et al.*, 1990; Martinez-Lage *et al.*, 1994) e na ostra *Crassostrea virginica* (Rodriguez Romero *et al.*, 1979).

As **bandas R** (ou bandas reversas) são, por definição, bandas opostas ás bandas G e complementares destas (ISCN, 1985). A combinação destas duas técnicas ao mesmo conjunto de cromossomas, poderá fornecer uma informação suplementar.

Se até ao momento, foram efectuadas algumas tentativas de aplicação das bandas G aos cromossomas de bivalves, não existe, porém, qualquer referência no que diz respeito à aplicação da técnica de marcação pelas bandas R a estes organismos. Aliás, foram poucos os estudos efectuados nos invertebrados em geral, como nos insectos (Warchalowska-Sliwa *et al.*, 1978; Marchi e Rai, 1986) e mesmo nos vertebrados inferiores (Butet e Volubouev, 1995).

Neste capítulo são apresentadas:

a) a caracterização do cariótipo das espécies de ostras: *Crassostrea gigas, Crassostrea angulata, Crassostrea virginica, Crassostrea rhizophorae, Crassostrea ariakensis, Crassostrea gasar, Crassostrea sikamea, Saccostrea commercialis* e *Ostrea edulis,* através do estabelecimento do cariótipo padrão por análise morfométrica e aplicação da técnica de coloração selectiva das NORs, para a identificação de pares de cromossomas específicos;

b) a aplicação da técnica de coloração selectiva para as bandas C às espécies *Crassostrea gigas*, *Crassostrea virginica* e *Ostrea edulis;*

c) a identificação individual de cada par de cromossomas, através da aplicação das técnicas de coloração pelas bandas G e R às espécies: *Crassostrea gigas*, *Crassostrea angulata*, *Crassostrea virginica* e *Ostrea edulis;*

d) uma experiência preliminar de aplicação da técnica de hibridação *in situ* às espécies: *Crassostrea gigas* e *Crassostrea virginica*.

Material e métodos

Material

Neste trabalho foram estudadas nove espécies de ostras com interesse comercial (Figura 1): *Crassostrea gigas, Crassostrea angulata, Crassostrea virginica, Crassostrea rhizophorae, Crassostrea ariakensis, Crassostrea gasar, Crassostrea sikamea, Saccostrea commercialis* e *Ostrea edulis.*

As diversas espécies, origem, número e tamanho dos indivíduos estudados por espécie, encontram-se detalhados no Quadro 2. Todas as espécies foram submetidas a um período de quarentena após a recolha no local de origem, no laboratório "Génétique et Pathologie" do IFREMER, La Tremblade.

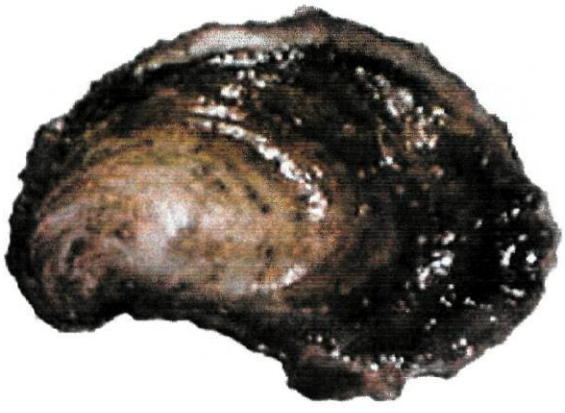
Figura 1: Espécies de ostras estudadas nesta tese.



Crassostrea gigas



Crassostrea angulata



Crassostrea virginica



Crassostrea rhizophorae



Crassostrea ariakensis



Crassostrea gasar



Crassostrea sikamea



Saccostrea commercialis



Ostrea edulis

Quadro 2: Espécies estudadas, origem, número e tamanho dos animais utilizados.

Espécies estudadas	Origem	Nºde indíviduos utilizados neste estudo	Tamanho dos animais
Crassostrea gigas	La Tremblade IFREMER (França)	83	3 – 5
Crassostrea angulata	Estuário do rio Sado Setubal (Portugal)	24	4,5 - 4,9
Crassostrea virginica	New Brunswick Canada	120	2 - 3
Crassostrea rhizophorae	Guyana francesa	2	4,2 -4,5
Crassostrea ariakensis	New Jersey Estados Unidos	2	8,3 -9,5
Crassostrea gasar	Casamance Senegal	2	5 - 5,9
Crassostrea sikamea	Bodega bay Estados Unidos	3	4,5 - 5,1
Saccostrea commercialis	New South Wales Australia	2	4,7 - 4,9
Ostrea edulis	La Tremblade IFREMER (França)	187	3,5 - 4,7

Tamanho dos animais em cm

Métodos

1. Cariótipo padrão

Acondicionamento dos animais

O transporte das espécies estudadas foi efectuado em recipientes húmidos, o mais rapidamente possível (menos de 24 horas), desde o "Laboratoire Génétique et Pathologie", IFREMER de La Tremblade, onde foram criadas ou onde se encontravam em quarentena até ao Observatório de Villefranche sur Mer, onde todo o estudo cromossómico foi efectuado. Antes de se efectuar o transporte, todas as espécies foram previamente acondicionadas no "Laboratoire Génétique et Pathologie", IFREMER de La Tremblade. Este transporte pode gerar uma situação de "stress" nos animais o qual, por sua vez, pode dar origem a uma redução ou mesmo uma interrupção da proliferação celular. Como esta proliferação é indispensável para a realização das técnicas de citogenética, os animais devem ser processados o mais rapidamente possível, para a realização dos esfregaços cromossómicos.

Uma vez no laboratório de Villefranche sur Mer, os animais foram colocados em aquários com água do mar aerificada, a uma temperatura compreendida entre os 17 e os 20°C e alimentados com a microalga *Isochrysis galbana*. Esta etapa tinha como objectivo, adaptar os animais às condições do laboratório, para que este recupere o ritmo celular normal, ou seja que recupere um bom índice mitótico.

Obtenção das preparações cromossómicas

Os esfregaços cromossómicos obtiveram-se mediante a técnica de suspensão celular de Thiriot-Quiévreux e Ayraud (1982). Descrevem-se em seguida as diferentes etapas da referida técnica:

Bloqueio das mitoses em metafase

A colquicina é um alcalóide que impede a formação do fuso acromático, dissolvendo a tubulina, que é um dos elementos constituintes das fibras do referido fuso. Esta interferência provoca o bloqueio temporário da divisão celular, acumulação de células em metafase e aumento da condensação dos cromossomas. Um tratamento demasiado

longo com a colquicina, leva a uma condensação cromossómica demasiado alta; pelo contrário, um tempo demasiado curto e/ou uma concentração débil podem provocar a ausência de acumulação de células em metafase.

Os animais foram sujeitos a uma solução de colquicina a 0,005% em água salgada aerificada (à solução foi adicionada a microalga *Isochrysis galbana*), durante a noite por 5 a 10 horas, ao fim das quais se dissecaram as brânquias.

Choque hipotónico

O tratamento com uma solução hipotónica tem por finalidade provocar a turgidez das células e uma boa dispersão dos cromossomas.

Após dissecação, as brânquias foram colocadas numa solução de citrato de sódio a 0,9%, durante 30 minutos.

Fixação

A fixação tem como função a conservação de todas as estruturas da célula.

As brânquias foram fixadas numa solução de três volumes de álcool etílico para um volume de ácido acético, sendo realizados três banhos sucessivos de 20 minutos cada.

A solução fixadora deve ser preparada no momento da sua utilização e deve encontrar-se a uma temperatura de 4°C aproximadamente.

Execução das lâminas

A totalidade da brânquia, ou uma sua porção, segundo o tamanho, foi colocada numa lâmina escavada com água acidificada, durante alguns instantes, facilitando a libertação celular com o auxílio de pinças. A suspensão celular obtida foi aspirada com uma pipeta Pasteur, sendo depois libertada a uma altura de 30 cm, sobre uma lâmina poisada num porta-objectos previamente aquecido a 44°C. O líquido foi re-aspirado rapidamente, levando à formação de duas auréolas.

Coloração

A coloração com o corante Giemsa é a mais frequentemente utilizada para a obtenção de cariótipos padrão, uma vez que permite uma boa observação da morfologia dos cromossomas.

Os esfregaços cromossómicos foram corados com uma solução Giemsa composta por 4ml do corante + 4 ml de tampão fosfato (pH 6.8) + 92 ml de água destilada, durante 9 minutos. Ao fim desse tempo, as lâminas são lavadas com água destilada, deixando-se secar ao ar.

Observação das lâminas e microfotografia

Procedeu-se à observação sistemática das lâminas ao microscópio óptico, seleccionando-se as melhores metafases. É de sublinhar que as técnicas de citogenética de invertebrados marinhos, exigem grande tenacidade na observação microscópica, uma vez que: 1- a obtenção de mitoses é frequentemente aleatória; 2- o índice mitótico é baixo; 3- a obtenção de mitoses depende bastante do estado do animal estudado, ao contrário das culturas celulares dos vertebrados que asseguram uma obtenção regular de mitoses. As melhores metafases seleccionadas são fotografadas com um fotomicroscópio ZeissIII e um filme Kodak Technical Pan 2415. Para a revelação do filme utilizou-se o revelador Kodak D-76 e o fixador Kodak Unifix; para a revelação do papel (Kodabrome) foi utilizado o revelador Kodak Dektol e o mesmo fixador referido acima.

Elaboração do cariótipo e análise morfométrica

Os cromossomas das melhores metafases foram recortados das microfotografias e ordenados de acordo com o seu tamanho e morfologia, de modo a obter-se o cariótipo da espécie estudada.

Um cromossoma metafásico apresenta duas características morfológicas quantificáveis: o seu comprimento relativo e a posição do centrómero. Um sistema de nomenclatura que permite uniformizar a terminologia e simplificar o reconhecimento dos cromossomas foi descrito por Levan *et al.* (1964). Este sistema baseia-se na

determinação da posição do centrómero através do cálculo do índice centromérico (Ic), que é igual a 100 x (comprimento do braço curto/ comprimento total do cromossoma), ou da relação entre os dois braços cromossómicos conhecida como "Arm ratio" (Ar), que é igual ao comprimento do braço longo/comprimento do braço curto.

Os cromossomas classificam-se posteriormente em 4 categorias, segundo os valores obtidos dos parâmetros acima definidos (Quadro 3): se o centrómero se localiza na região mediana, o cromossoma diz-se metacêntrico (m); se apresenta uma posição submediana, o cromossoma diz-se submetacêntrico (sm); se se encontra na região subterminal, o cromossoma é subtelocêntrico (st); se se encontra na região terminal o cromossoma é telocêntrico (t).

Quadro 3: Valores limite das quatro categorias acima descritas para o índice centromérico e para a razão dos braços.

Posição do centrómero	Nomenclatura	Indice centromérico	"Arm ratio"
Ponto médio	Metacêntrico (M)	50	1
Região mediana	metacêntrico (m)	37,5-50	1-1,67
Região submediana	submetacêntrico (sm)	25,0-37,5	1,67-3,00
região subterminal	subtelocêntrico (st)	12,5-25,0	3,00-7,00
Regoão terminal	telocêntrico (t)	0-12,5	7,00-00
Ponto terminal	Telocêntrico (T)	0	0

A análise morfométrica baseia-se portanto, no comprimento do braço curto e no comprimento do braço longo de cada cromatídeo de um cromossoma, tendo sido as medidas destes comprimentos efectuadas nas 10 melhores metafases de cada espécie.

As medidas foram realizadas directamente, utilizando-se uma mesa digitalizadora (Summa Sketcht II), ligada a um computador Apple Macintoch Classic equipado com um programa em linguagem Basic. Em cada cromatídeo foi medido o comprimento do braço curto e do braço longo.

Mediante um "macro" do programa Excell, foram tratadas as medidas obtidas e calculados os seguintes parâmetros:

1 - comprimento absoluto do complemento diplóide, que corresponde à soma dos comprimentos de todos os cromossomas;

2 - comprimento absoluto do complemento haplóide, que corresponde à metade do comprimento absoluto do complemento diplóide;

3 - comprimento absoluto de um par de cromossomas, que corresponde à média dos comprimentos dos dois cromossomas;

4 - comprimento relativo de um par de cromossomas, que corresponde a 100 x (comprimento absoluto/comprimento absoluto do complemento haplóide);

5 - índice centromérico de um par de cromossomas, que corresponde à média dos índices centroméricos dos quatro cromatídeos;

6 - razão dos braços de um par cromossómico, que corresponde à média das razões dos braços dos quatro cromatídeos.

Posteriormente, a partir dos 10 valores de cada parâmetro (correspondentes às melhores metafases), calculou-se a média (M) dos comprimentos absolutos do complemento diplóide, dos comprimentos relativos, dos índices centroméricos e dos "Arm ratios" de cada par cromossómico. A caracterização dos cariótipos, através das medidas dos cromossomas das 10 metafases, permite a elaboração de um modelo gráfico que, por sua vez, nos fornece uma melhor visualização dos resultados.

Actualmente não existe uma regra geral para o ordenamento dos cromossomas de uma espécie não estudada previamente. Alguns autores adoptam o critério do tamanho decrescente dos cromossomas, enquanto que outros adoptam como critério principal a localização do centrómero no cromossoma. A ausência de uma regra geral faz com que o cariótipo de uma mesma espécie possa apresentar diferentes ordenações. Ao longo deste trabalho, estabeleceu-se que se ordenariam sempre os cromossomas segundo o critério do tamanho decrescente nas tabelas de medidas e por categorias morfológicas nos modelos gráficos, de forma a facilitar a comparação entre as diferentes espécies estudadas.

2. Cariótipos com marcação cromossómica

Regiões dos organizadores nucleolares - NORs

As regiões dos organizadores nucleolares foram aqui coradas pela técnica do nitrato de prata amoniacal de Howell e Black (1980), modificada por Gold e Ellison (1982).

Prepararam-se as duas soluções seguintes:

- solução 1: solução coloidal, composta por 2g de gelatina+1ml de ácido fórmico+10ml de água destilada;
- solução 2: solução de nitrato de prata, composta por 4g de nitrato de prata e 8ml de água destilada.

Os esfregaços cromossómicos foram tratados com duas gotas da solução coloidal e quatro gotas da solução de nitrato de prata. A lâmina foi coberta com uma lamela e incubada sobre uma placa aquecida a 44°C durante 8 minutos. Ao fim deste tempo, a lâmina foi lavada com água destilada. Uma vez secas, as lâminas foram observadas ao microscópio, fotografando-se as melhores metafases.

Na observação microscópica, os núcleos apresentam uma coloração amarelo dourada, enquanto a coloração das NORs e dos nucléolos apresenta uma tonalidade escura. As lâminas com marcação das regiões organizadoras nucleolares, devem ser observadas e fotografadas o mais rapidamente possível, uma vez que a cor e a preparação tendem a deteriorar-se rapidamente.

Bandas C

A técnica aqui utilizada foi a descrita por Sumner (1972). No entanto para adaptação desta técnica aos cromossomas das ostras, foram efectuadas algumas modificações a nível do tempo de tratamento com o hidróxido de bário (diminuição).

As principais etapas do protocolo utilizado foram:

- envelhecimento das preparações cromossómicas.

Os melhores resultados foram obtidos com lâminas de idade compreendida entre os 15 e os 40 dias de idade;

- incubação na solução de HCl 0,2N durante uma hora à temperatura ambiente;
- lavagem com água destilada;
- incubação numa solução de hidróxido de Bário 0,3N a 50°C, durante um intervalo de tempo de 30 segundos a um minuto e meio (intervalo de tempo dependente da idade das lâminas e da quantidade de material nelas existente);
- lavagem com água destilada;
- incubação numa solução de 2xSSC a 60°C, durante uma hora;
- lavagem com água destilada;
- coloração com o corante Giemsa a 4% em tampão fosfato pH 6.8 durante 90 minutos.

A observação das lâminas e execução das microfotografias foram efectuadas num microscópio equipado com contraste de fase.

Bandas G

Neste capítulo, foram utilizadas duas técnicas na tentativa de obtenção de um modelo de bandas G:

1° Método de utilização da tripsina (Seabright 1971)

Esta técnica foi aplicada a lâminas da espécie *Ostrea edulis*.

Para adaptação aos cromossomas das ostras, foram efectuadas algumas modificações ao protocolo original, no que diz respeito ao tempo e concentração do tratamento com a tripsina (diminuição).

Protocolo utilizado:

- incubação das lâminas numa solução de tripsina a 0,125%, á temperatura ambiente, durante 15 segundos;
- lavagem com água destilada;
- coloração com o Giemsa a 2% em tampão fosfato pH 6,8 durante 90 minutos.

2º Método ASG

Foi utilizado o método ASG (Acetic/Saline/Giemsa) de Sumner *et al.*, (1971). Esta técnica foi aplicada às lâminas das espécies: *Crassostrea gigas*, *Crassostrea angulata*, *Crassostrea virginica* e *Ostrea edulis*.

Protocolo utilizado:

- envelhecimento das preparações cromossómicas. Os melhores resultados foram obtidos com lâminas de idade compreendida entre os 5 e os 10 dias de idade;
- incubação das preparações numa solução de 2xSSC durante 1 hora;
- lavagem com água destilada;
- coloração com o Giemsa a 2% em tampão fosfato pH 6.8 durante 90minutos.

Bandas R

Foi utilizado o método de Dutrillaux e Covic (1974).

Protocolo utilizado:

- incubação dos esfregaços cromossómicos na solução de Earle a 87ºC de 5 a 15 minutos;
- lavagem com água destilada;
- coloração com o Giemsa a 4% durante 9 minutos.

Hibridação *in situ*

Foram efectuados dois ensaios desta técnica:

1º Ensaio - Junho 1997

Este primeiro ensaio foi efectuado em colaboração com a Doutora Paula Coelho , do Centro de Citologia Experimental da Universidade do Porto.

O protocolo de hibridação *in situ* utilizado, foi o praticado naquela instituição, em *Drosophila sp*, (Ashburner, 1989; Gonzalez e Glover, 1993).

Foram modificados alguns parâmetros do protocolo, e utilizadas sondas centroméricas humanas e sondas centroméricas de *Drosophila sp.* As modificações

efectuadas ao protocolo original disseram respeito essencialmente à temperatura e á duração dos tratamentos.

O nosso protocolo foi aplicado a lâminas de *Crassostrea virginica,* de acordo com as seguintes etapas:

- preparação e marcação da sonda com a biotina por "Nick translation";
- verificação da etapa precedente pelo "Dot-Blot";
- desnaturação das lâminas;
- preparação das sondas;
- hibridação;
- lavagens pós-hibridação;
- detecção após coloração com a avidina-fluoresceína (amplificação do sinal);
- observação ao microscópio de fluorescência.

2º Ensaio - Dezembro 1998

Este ensaio foi efectuado em colaboração com a Drª. Raquel Gonçalves, do laboratório de Citogenética da Universidade de Vila Real.

O interesse particular deste ensaio residiu no facto, de ter sido utilizada uma sonda, com as sequências que codificam o gene da amilase na ostra *Crassostrea gigas*, fornecida pela estação marinha de Concarneau (França).

O protocolo utilizado é o utilizado por rotina nas preparações cromossómicas de bovinos, no laboratório de genética da Universidade de Vila Real.

Algumas modificações foram introduzidas a esse protocolo para o adaptar aos cromossomas das ostras. Essas modificações foram efectuadas sobretudo ao nível do processo de desnaturação dos cromossomas.

As principais etapas do protocolo aplicado às lâminas de *Crassostrea gigas*, preparadas no laboratório de Villefranche sur Mer, foram:

- preparação e marcação da sonda com a biotina por "Nick translation";
- verificação da etapa precedente pelo "Dot-Blot";
- desnaturação das lâminas;
- preparação das sondas;
- hibridação;

- lavagens pós-hibridação;
- detecção após coloração com a avidina-fluoresceína (amplificação do sinal);
- observação ao microscópio de fluorescência.

Resultados

1. Cariótipo padrão e regiões dos organizadores nucleolares-NORs

Ostrea edulis

Cariótipo padrão

Foi estabelecido o cariótipo padrão (Figura 2), dos animais estudados, apresentando o número diploide de 2n=20 estabelecido por Longwell *et al.*, 1967. O cariótipo estabelecido após análise morfométrica (Figura 3 e Quadro 4) é constituido por 5 pares de cromossomas metacêntricos e cinco pares de cromossomas submetacêntricos, como o previamente determinado, por Thiriot-Quiévreux (1984).

Foi igualmente realizada uma análise morfométrica comparativa dos pares de cromossomas de três populações de *Ostrea edulis*: La Tremblade, Barfleur e Sete (Figura 4).

Regiões organizadoras do nucléolo

Thiriot-Quiévreux e Insua (1992) observaram duas Ag-NORs nesta espécie, nos pares 9 e 10 em homo ou heterozigotia.

Nas 47 metafases estudadas, das quais foram efectuados 12 cariótipos, observamos as duas NORs referidos por Thiriot-Quiévreux e Insua 1992, e igualmente uma Ag-NOR suplementar no par n°7 (Figura 5) em homo ou heterozigotia (Quadro 5).

Quadro 5: Distribuição das Ag-NORs na espécie *Ostrea edulis*

Par n°	Percentagem observada	
	homozigotia	heterozigotia
7	1%	13%
9	9%	69%
10	66%	32%

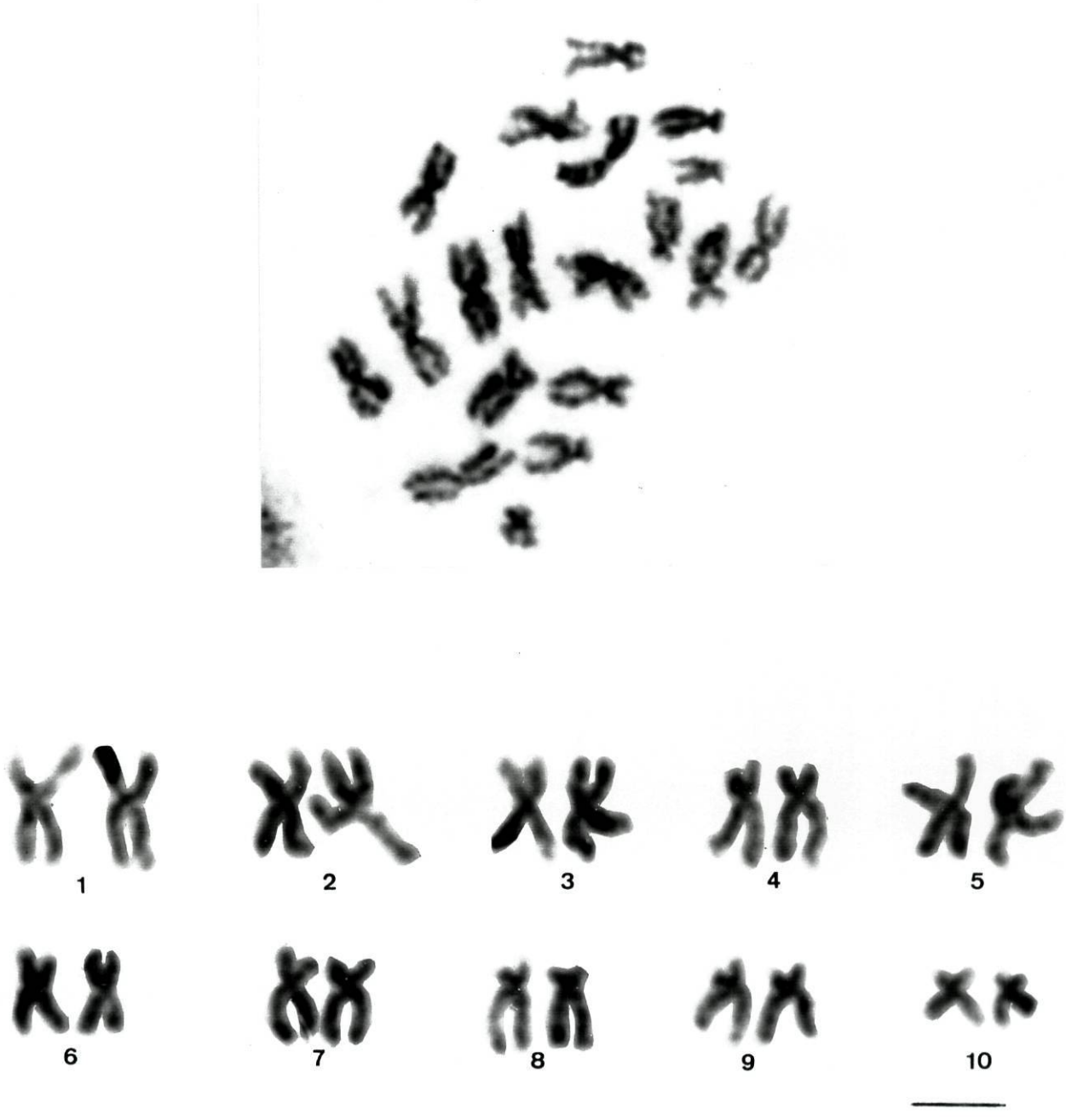


Figura 2: Metafase mitótica e cariótipo padrão de *Ostrea edulis*. Barra de escala=5μm.

Quadro 4: Comprimento relativo, "Arm ratio", Índice centromérico e classificação de cada par cromossómico de *Ostrea edulis*.

Par de cromossomas	Comprimento relativo		Arm ratio		Indice centromérico		Classificação
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	
1	12,81	0,97	0,88	0,08	46,55	2,04	m
2	11,78	0,46	0,89	0,12	46,85	2,81	m
3	11,13	0,41	0,90	0,06	47,19	1,36	m
4	10,96	1,23	0,57	0,06	36,21	2,65	sm
5	10,79	0,53	0,89	0,07	46,75	2,02	m
6	10,00	0,62	0,91	0,11	47,08	2,85	m
7	9,60	0,52	0,50	0,08	32,88	3,72	sm
8	8,78	0,50	0,48	0,10	32,02	4,60	sm
9	8,04	0,81	0,36	0,04	26,04	2,31	sm
10	6,11	0,30	0,48	0,07	32,14	3,27	sm

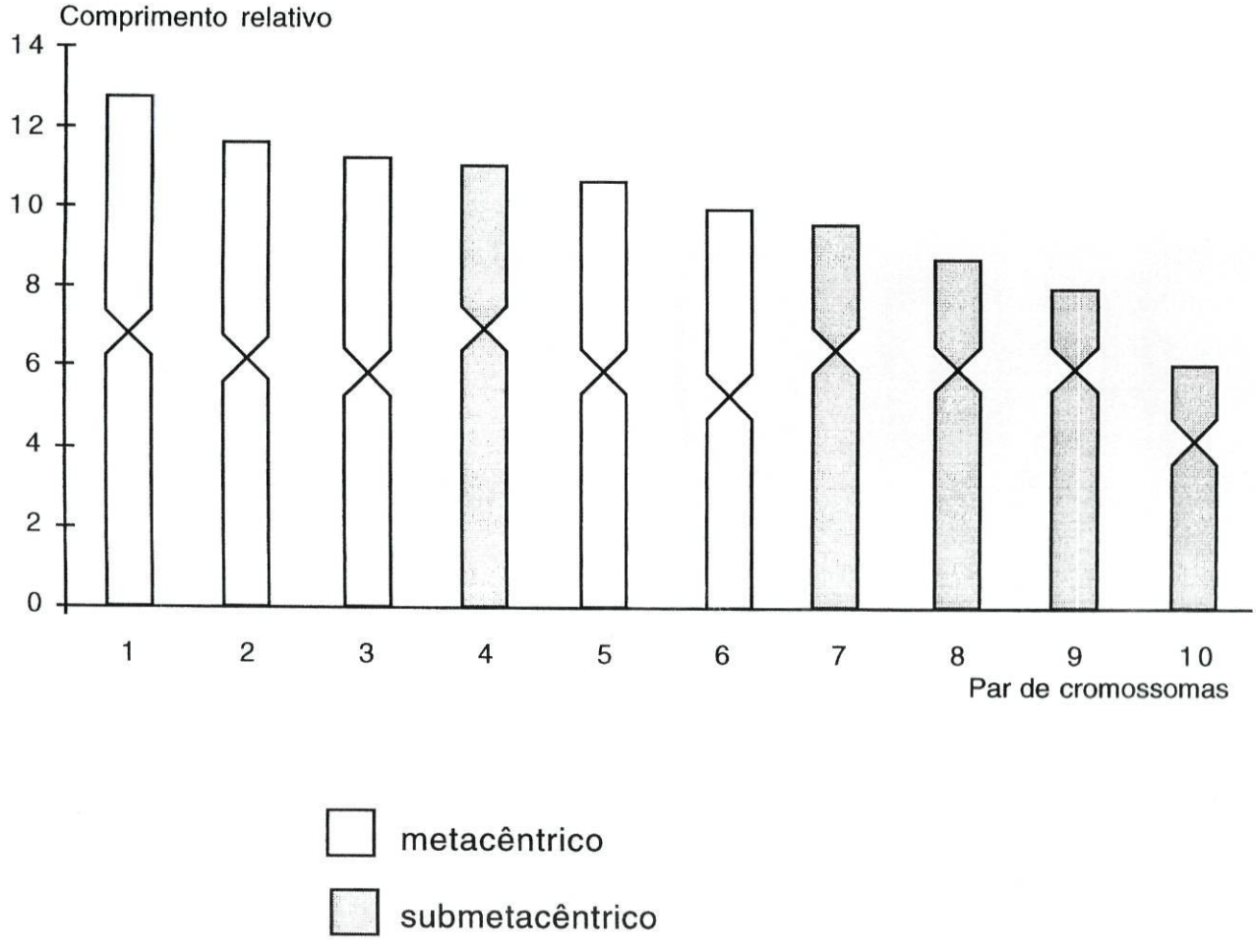


Figura 3: Ideograma representativo do cariótipo de *Ostrea edulis*, elaborado a partir dos valores do comprimento relativo e do índice centromérico de cada par de cromossomas.

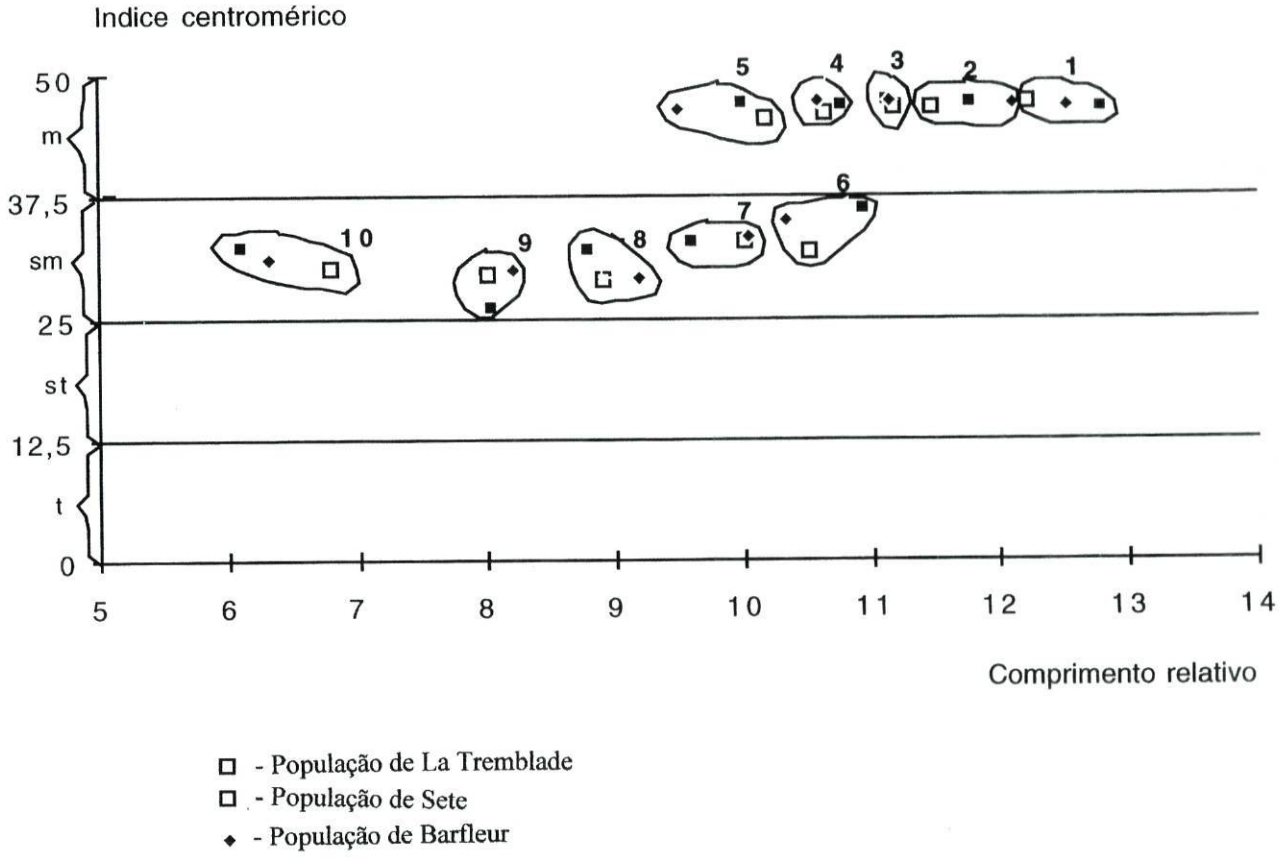


Figura 4: Comparação dos diferentes pares de cromossomas de três populações de *Ostrea edulis*: população de La Tremblade, população de Sete e população de Barfleur.

ICBAS



Figura 5: **A.** Metafase mitótica de *Ostrea edulis* com marcação das Ag-NORs. **B.** Cariótipos de *Ostrea edulis* com marcação para as Ag-NORs. As setas assinalam as Ag-NORs. Barra de escala=5μm.

Crassostrea gigas

Cariótipo padrão

Neste capítulo, foram analisadas 54 metafases de *C. gigas* coradas com o Giemsa (das quais efectuamos 10 cariótipos) para estabelecimento do cariótipo padrão (figura 6).

O cariótipo estabelecido após análise morfométrica (Figura 7, Quadro 6) consiste em 10 pares de cromossomas metacêntricos, o que confirma o previamente estabelecido por Thiriot-Quiévreux (1984).

Regiões dos organizadores nucleolares - NORs

As Ag-NORs foram observadas nos braços curtos do par nº 10 em homo ou heterozigotia, de acordo com o previamente descrito por Thiriot-Quiévreux e Insua (1992).

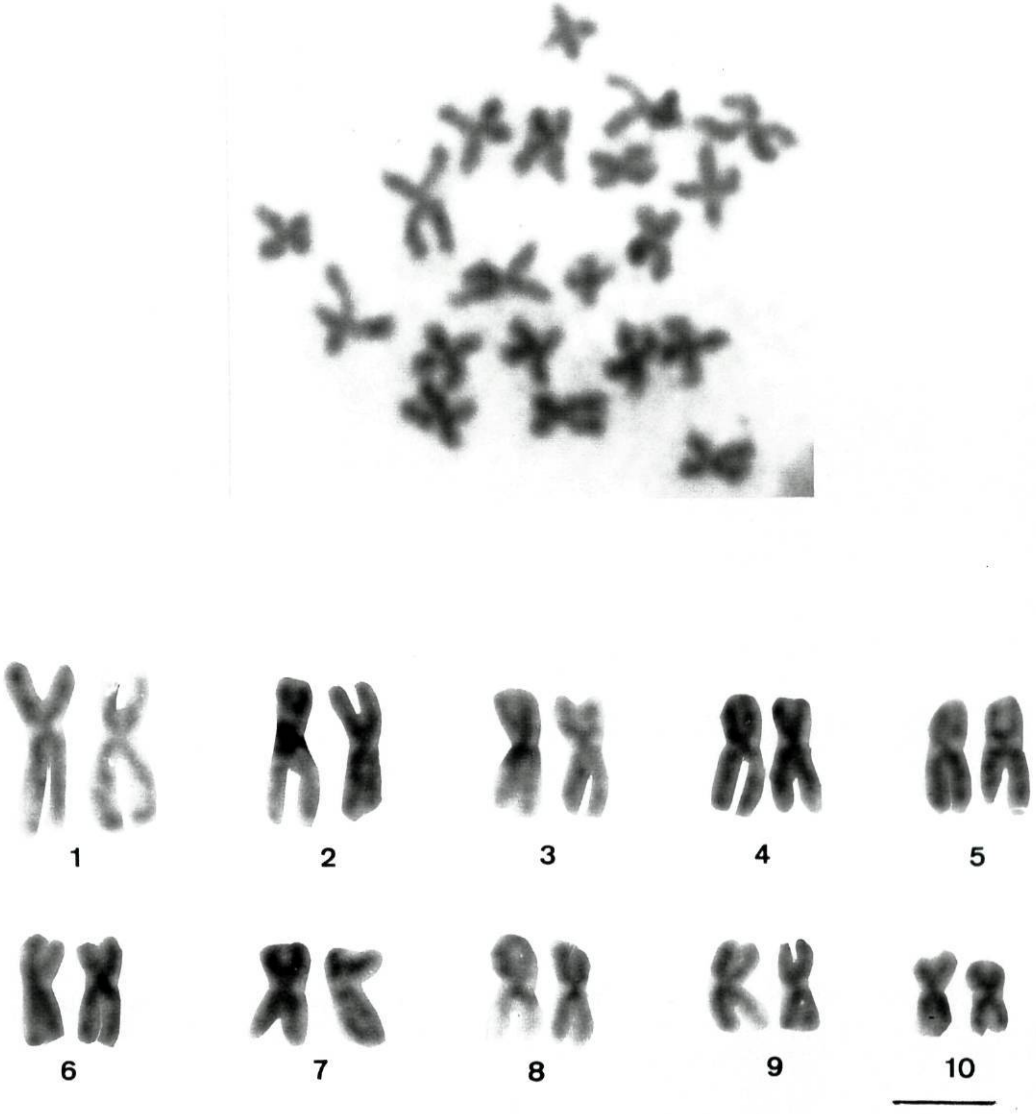


Figura 6: Metafase mitótica e cariótipo padrão de *Crassostrea gigas*. Barra de escala=5μm.

Quadro 6: Comprimento relativo, "Arm ratio", Índice centromérico e Classificação de cada par cromossómico de *Crassostrea gigas*.

Par de cromossomas	Comprimento relativo		Arm ratio		Indice centromérico		Classificação
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	
1	13,67	0,66	0,83	0,09	45,05	2,54	m
2	12,16	0,42	0,92	0,11	47,5	2,83	m
3	11,25	0,64	0,89	0,12	46,7	3,3	m
4	10,52	0,45	0,89	0,12	46,7	3,1	m
5	10,09	0,64	0,94	0,09	48,07	2,13	m
6	9,35	0,32	0,96	0,07	48,63	1,62	m
7	9,07	0,54	0,92	0,11	47,54	2,99	m
8	8,87	0,81	0,96	0,12	48,55	3,1	m
9	8,37	0,46	0,96	0,11	48,55	2,76	m
10	6,67	0,91	1	0,15	49,3	3,22	m

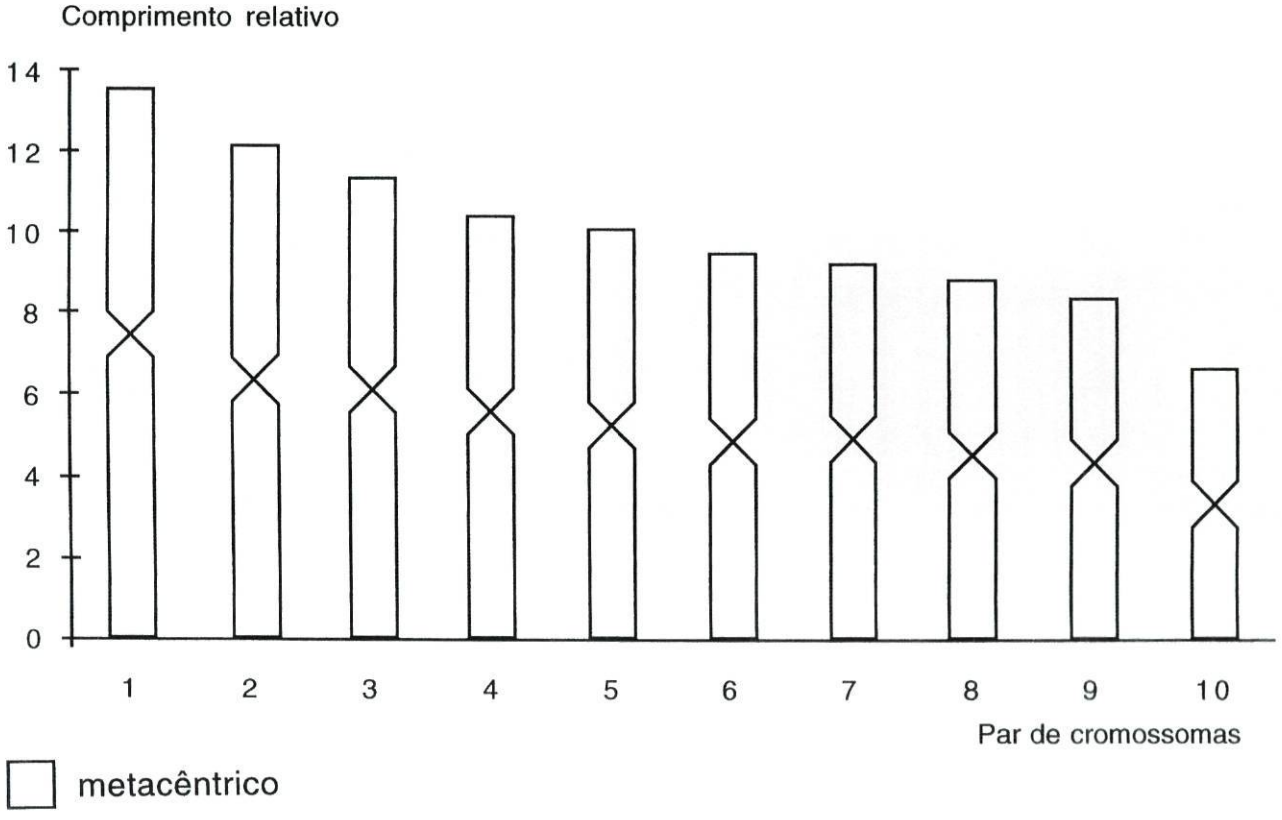


Figura 7: Ideograma representativo do cariótipo de *Crassostrea gigas*, elaborado a partir dos valores do comprimento relativo e do índice centromérico de cada par de cromossomas.

População de Argenton

Numa população de *Crassostrea gigas* (População de Argenton), foi observada a presença de um cromossoma suplementar em 2 dos 11 animais estudados. Nestes animais, o cromossoma suplementar era de dois tipos: (I) cromossoma supranumerário de grande tamanho (Fig. 8A), (II) cromossoma supranumerário de pequeno tamanho (Fig. 8 B).



Figura 8: Cariótipos padrão 2n=21 de *Crassostrea gigas* (População de Argenton). **A.** presença de cromossoma supranumerário de grande tamanho. **B.** presença de cromossoma supranumerário de pequeno tamanho. Barra de escala=5µm.

Para averiguar se o cromossoma supranumerário de pequeno tamanho corresponderia a um caso de trissomia do par nº10 (par portador de NORs), aplicou-se a técnica de coloração das Ag-NORs a estes animais (Fig. 9).

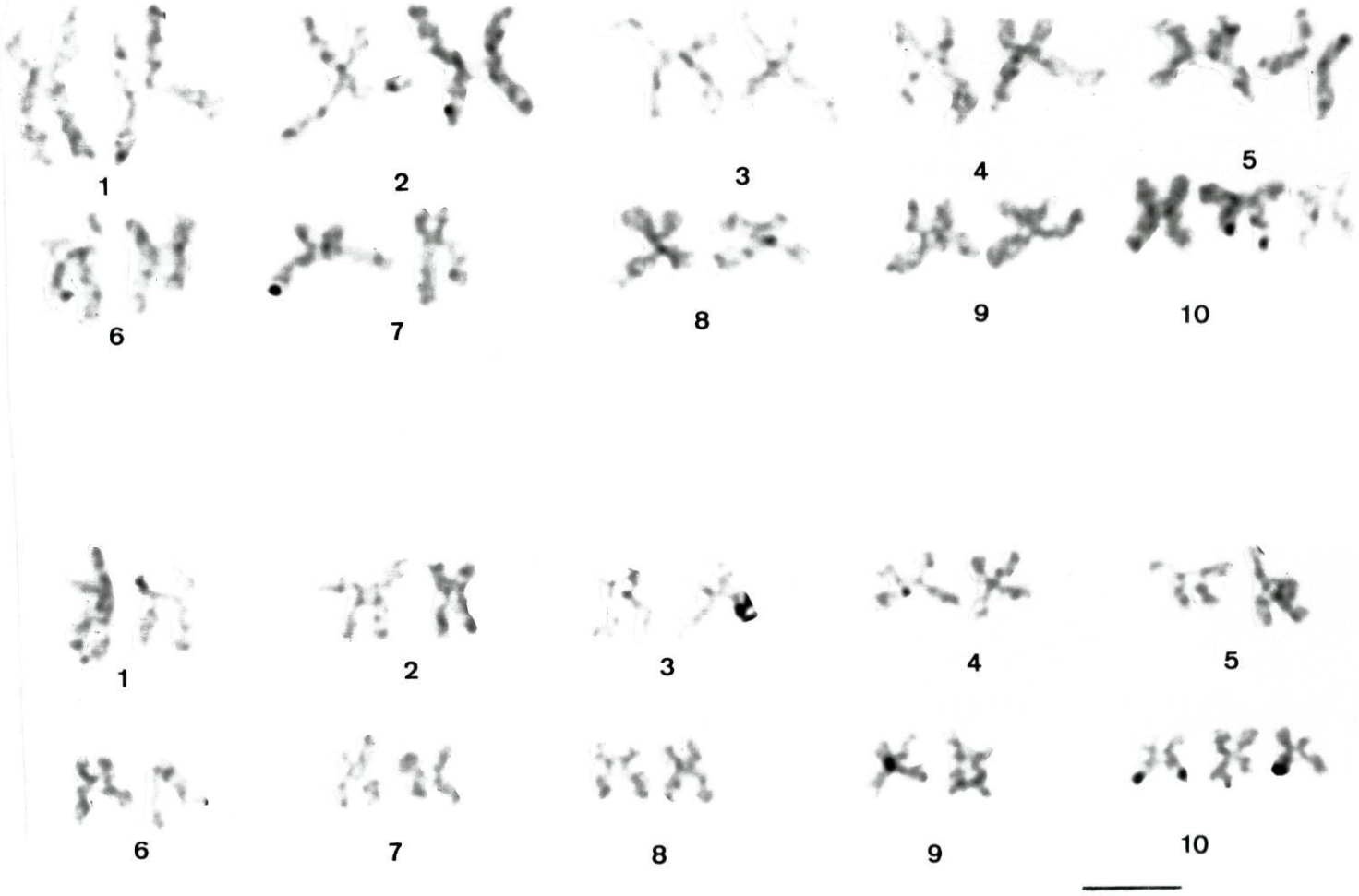


Figura 9: Cariótipos Ag-NORs 2n=21 de *Crassostrea gigas* (População de Argenton). Barra de escala=5µm.

Não nos foi, no entanto, possível concluir se se tratava ou não de uma trissomia do par nº 10, na medida em que neste par as NORs aparecem, como dito anteriormente, em homo ou heterozigotia. Como em nenhum dos casos pudemos observar marcação pela prata nos três cromossomas de mais pequeno tamanho, não nos foi possível tirar conclusões.

Crassostrea angulata

Cariótipo padrão

O cariótipo (Figura 10 A, Quadro 7) aqui obtido após análise morfométrica, consiste em nove pares de cromossomas metacêntricos e um par de cromossomas submetacêntricos (par n°8).

Regiões dos organizadores nucleolares - NORs

A marcação Ag-NOR foi observada nos braços longos do par metacêntrico n° 10. Os dois cromossomas homólogos deste par apresentavam heteromorfismo na actividade aparente das NORs. O caso mais frequente (69%) foi o da marcação de apenas um cromosssoma (Figura 11 A).

Crassostrea sikamea

Cariótipo padrão

O cariótipo aqui obtido após análise morfométrica, apresenta nove pares de cromossomas metacêntricos e um par de cromossomas submetacêntricos (par n°6) (Figura 10B, Quadro 7).

Regiões dos organizadores nucleolares - NORs

As Ag-NORs foram observadas nas extremidades dos braços longos dos pares de cromossomas metacêntricos n° 9 e 10 (Figura11B). Foi observado um número variável de uma a três Ag-NORs. 54% das metafases coradas com o nitrato de prata mostraram NORs marcadas apenas no par n° 10. O caso mais frequente (61%) foi o de uma Ag-NORs no par n° 10.



Figura 10: Cariótipos padrão de seis espécies de ostras rugosas. A. *Crassostrea angulata*, B. *Crassostrea sikamea*, C. *Crassostrea virginica*, D. *Crassostrea ariakensis*, E. *Crassostrea gas*ar, F. *Saccostrea commercialis*. As setas assinalam os pares submetacêntricos. Barra de escala=5μm.

Quadro 7: Comprimento relativo, "Arm ratio", Índice centromérico e Classificação de cada par cromossómico de sete espécies de ostras rugosas.

Par de cromossomas	Comprimento relativo		"Arm ratio"		Índice centromérico		Classificação
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	
C. angulata							
1	12.81	0.91	0.79	0.08	43.79	2.50	m
2	11.34	0.41	0.84	0.09	45.22	2.45	m
3	10.75	0.41	0.83	0.09	45.02	2.65	m
4	10.33	0.63	0.64	0.09	38.46	2.89	m
5	10.12	0.74	0.82	0.06	44.79	1.86	m
6	9.82	0.60	0.62	0.07	38.01	2.56	m
7	9.53	0.82	0.88	0.07	46.47	1.94	m
8	9.25	0.68	0.59	0.07	36.84	3.01	sm
9	8.98	0.66	0.68	0.12	40.07	3.83	m
10	7.08	0.67	0.75	0.10	42.36	3.44	m
C. sikamea							
1	12.40	1.17	0.85	0.17	45.24	4.35	m
2	11.28	0.59	0.77	0.10	43.08	2.99	m
3	11.20	0.64	0.87	0.12	46.03	3.38	m
4	10.39	0.93	0.86	0.12	45.92	3.14	m
5	10.38	0.78	0.85	0.13	45.41	3.89	m
6	9.87	0.89	0.53	0.13	34.20	5.27	sm
7	9.50	0.76	0.79	0.13	43.72	4.36	m
8	9.27	1.19	0.79	0.08	43.52	2.48	m
9	8.61	0.89	0.82	0.20	44.28	6.39	m
10	7.10	1.05	0.95	0.18	47.75	4.98	m
C. virginica							
1	12.71	0.67	0.88	0.08	46.46	2.51	m
2	11.50	0.56	0.87	0.11	46.27	3.03	m
3	10.89	0.90	0.79	0.11	43.61	3.62	m
4	10.57	0.71	0.46	0.08	30.97	3.49	sm
5	10.33	0.47	0.82	0.08	44.63	2.34	m
6	9.62	0.61	0.74	0.09	42.18	3.19	m
7	9.38	0.92	0.79	0.16	43.52	5.43	m
8	9.16	0.69	0.43	0.10	29.34	4.57	sm
9	8.64	0.51	0.73	0.11	41.81	3.78	m
10	7.19	0.54	0.86	0.12	45.63	3.49	m
C. ariakensis							
1	12.10	0.63	0.82	0.07	44.65	2.09	m
2	11.34	0.43	0.77	0.10	42.98	3.47	m
3	10.67	0.46	0.78	0.07	43.71	2.10	m
4	10.54	0.59	0.51	0.05	33.77	2.32	sm
5	10.21	0.79	0.81	0.09	44.44	2.55	m
6	9.91	0.39	0.81	0.12	44.30	3.78	m
7	9.64	0.57	0.74	0.07	42.12	2.03	m
8	9.44	0.78	0.53	0.08	34.25	3.08	sm
9	9.09	0.90	0.79	0.17	43.41	5.00	m
10	7.07	0.43	0.76	0.12	42.64	3.86	m
C. gasar							
1	11.36	0.63	0.79	0.10	43.64	3.11	m
2	11.19	0.74	0.38	0.05	27.52	2.34	sm
3	11.04	0.41	0.85	0.08	45.62	2.47	m
4	10.62	0.76	0.62	0.07	37.80	2.31	m
5	10.54	0.51	0.90	0.09	46.95	2.45	m
6	9.97	0.43	0.86	0.08	45.77	2.33	m
7	9.64	0.54	0.84	0.12	45.21	3.54	m
8	9.54	0.64	0.45	0.07	30.78	3.43	sm
9	8.82	0.60	0.41	0.06	28.65	3.01	sm
10	7.28	0.56	0.39	0.08	27.89	3.78	sm
S. commercialis							
1	13.41	1.07	0.81	0.08	44.41	2.45	m
2	12.39	1.04	0.78	0.06	43.58	1.77	m
3	10.84	0.56	0.81	0.09	44.50	2.68	m
4	10.36	0.70	0.44	0.05	30.48	2.29	sm
5	9.89	0.74	0.80	0.08	44.07	2.58	m
6	9.82	0.66	0.81	0.11	44.32	3.48	m
7	9.13	0.98	0.48	0.07	32.24	2.98	sm
8	9.11	0.63	0.78	0.11	43.42	3.56	m
9	8.44	0.59	0.81	0.10	44.34	3.01	m
10	6.60	0.63	0.79	0.12	43.19	3.76	m
C.rhizophorae							
1	12.229	0.475	0.813	0.076	44.45	2.288	m
2	11.819	0.771	0.714	0.109	41.25	3.760	m
3	11.141	0.427	0.340	0.035	25.24	1.933	sm
4	10.686	0.672	0.809	0.157	44.13	5.015	m
5	10.524	0.574	0.614	0.055	37.81	2.235	m
6	9.850	0.454	0.742	0.098	42.29	3.109	m
7	9.455	0.575	0.328	0.041	26.544	2.169	sm
8	8.970	0.279	0.324	0.029	43.78	1.648	m
9	8.967	0.856	0.790	0.080	26.27	2.257	sm
10	6.360	0.334	0.333	0.031	26.61	1.646	sm

Crassostrea virginica

Cariótipo padrão

O cariótipo aqui obtido após análise morfométrica, apresenta oito pares de cromossomas metacêntricos e dois pares de cromossomas submetacêntricos (nº 4 e 8) (Figura 10C, Quadro 7).

Regiões dos organizadores nucleolares - NORs

As Ag-NORs foram observadas nas extremidades dos braços curtos dos pares nº 1 e 5 (Figura 11C). Foi observado um número variável de NORs marcadas (uma a três). O caso mais frequente (52%) foi o de uma Ag-NOR no par nº1 e uma Ag-NOR no par nº5.

Crassostrea ariakensis

Cariótipo padrão

O cariótipo aqui obtido após análise morfométrica, consiste em oito pares de cromossomas metacêntricos e dois pares de cromossomas submetacêntricos (pares nº 4 e 8) (Figura 10D, Quadro 7).

Regiões dos organizadores nucleolares - NORs

As Ag-NORs foram observadas nas extremidades dos pares metacêntricos nº 9 e 10. Foi observado um número variável de uma a três Ag-NORs (Figura 11D). 68% das metafases marcadas com prata apresentavam Ag-NORs somente no par nº 10.

Crassostrea gasar

Cariótipo padrão

O cariótipo aqui obtido após análise morfométrica, é constituido por seis pares de cromossomas metacêntricos e quatro pares de submetacêntricos (nº 2, 8, 9, e 10) (Figura 10E, Quadro 7).



Figura 11: Cariótipos com marcação das Ag-NORs des seis espécies de ostras rugosas. A. *Crassostrea angulata*, B. *Crassostrea sikamea*, C. *Crassostrea virginica*, D. *Crassostrea ariakensis*, E. *Crassostrea gas*ar, F. *Saccostrea commercialis*. As setas assinalam as Ag-NORs. Barra de escala=5μm.

Regiões dos organizadores nucleolares - NORs

As Ag-NORs foram encontradas nas extremidades dos braços curtos dos dois cromossomas homólogos do par nº2 (Figura 11E). Foi observado um heteromorfismo no tamanho das NORs em 49% das metafases examinadas.

Saccostrea commercialis

Cariótipo padrão

O cariótipo aqui obtido após análise morfométrica, apresenta oito pares de cromossomas metacêntricos e dois pares de cromossomas submetacêntricos (nº 4 e 7) (Figura 10F, Quadro 7).

Regiões dos organizadores nucleolares - NORs

As Ag-NORs foram observadas nos pares de cromossomas metacêntricos nº 9 e 10. Foi observado um número variável de uma a três Ag-NORs. 77% das metafases coradas pelo nitrato de prata apresentavam Ag-NORs apenas no par nº 10 (Figura 11F).

Crassostrea rhizophorae

Cariótipo padrão

O cariótipo aqui obtido após análise morfométrica, é constituido por seis pares de cromossomas metacêntricos e quatro pares de cromossomas submetacêntricos (nº 3, 7, 9, e 10) (Figura 12, Quadro 7).

Regiões dos organizadores nucleolares - NORs

As Ag-NORs foram observadas nas extremidades dos braços curtos do par nº 3 Foi observado um número variável de uma a duas Ag-NORs (Figura 13).

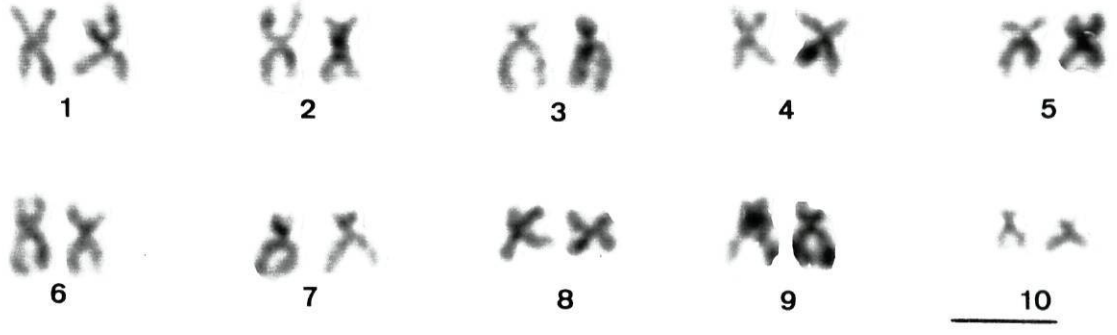


Figura 12: Cariótipo padrão de *Crassostrea rhizophorae*. Barra de escala=5μm.



Figura 13: Cariótipo com marcação para as Ag-NORs de *Crassostrea rhizophorae*. As setas assinalam as Ag-NORs. Barra de escala=5μm.

2. Análise cariológica comparativa

A Figura 14 (A e B) representa um ideograma, construído a partir dos valores dos comprimentos relativos e dos índices centroméricos (Quadro 7) das 8 espécies de ostras rugosas estudadas (géneros *Crassostrea e Sacostrea*).

Crassostrea gasar e *Crassostrea rhizophorae* distinguem-se imediatamente das outras espécies, pela presença no seu cariótipo de 4 pares de cromossomas submetacêntricos. *Crassostrea angulata* e *Crassostrea sikamea* apresentam apenas um par de cromossomas submetacêntricos, enquanto que *Crassostrea virginica*, *Crassostrea ariakensis* e *Saccostrea commercialis* possuem dois pares de cromossomas submetacêntricos.

Foi efectuada uma Análise de componentes principais (PCA-"Principal Component Analysis") a partir de uma base de dados com 80 objectos (10 metafases para cada um das oito espécies, descritas pelos valores de índice centromérico dos dez pares de cromossomas), que mostrou percentagens de variância nos cinco primeiros eixos de 31.74, 20.06, 12.61, 11.17, e 7.77 respectivamente.

A variância decresceu progressivamente a partir do quinto eixo, razão pela qual decidimos considerar apenas como relevante a informação fornecida pelos quatro primeiros eixos. A metade do plano (Figura 15) explica 51.80% da variância, e apresenta a separação de *C. gasar* e *C. rhizophorae* das outras espécies. As posições das seis espécies restantes sobrepõem-se num contínuo. A espécie *Crassostrea gigas* é a que se encontra mais distante relativamente a este contínuo. Logo a seguir, *Crassostrea ariakensis* e *Crassostrea virginica* estão muito próximas e sobrepõem-se numa parte de *S. commercialis* (correlações de 0.57, 0.43 e 0.52 respectivamente). *Crassostrea sikamea* (correlação 0.38) é a que apresenta a maior dispersão. Não é possível explicar a espécie *Crassostrea angulata* por este plano, devido à sua correlação de 0.01. Há uma nítida separação entre *C. virginica*, *C. ariakensis* e *S. commercialis* (correlações de 0.40, 0.17 e 0.55 respectivamente). *Crassostrea angulata* e *Crassostrea sikamea* permanecem juntas (correlações de 0.48 e 0.55 respectivamente).

A Figura 16 apresenta o dendograma da Classificação ascendente hierárquica (HCA) efectuada, utilizando a informação dos 4 primeiros eixos do "PCA", através do método de aglomeração de Ward (1963). As espécies *Crassostrea gasar* e *Crassostrea rhizophorae* aparecem claramente separadas de todas as outras. Dois grupos se

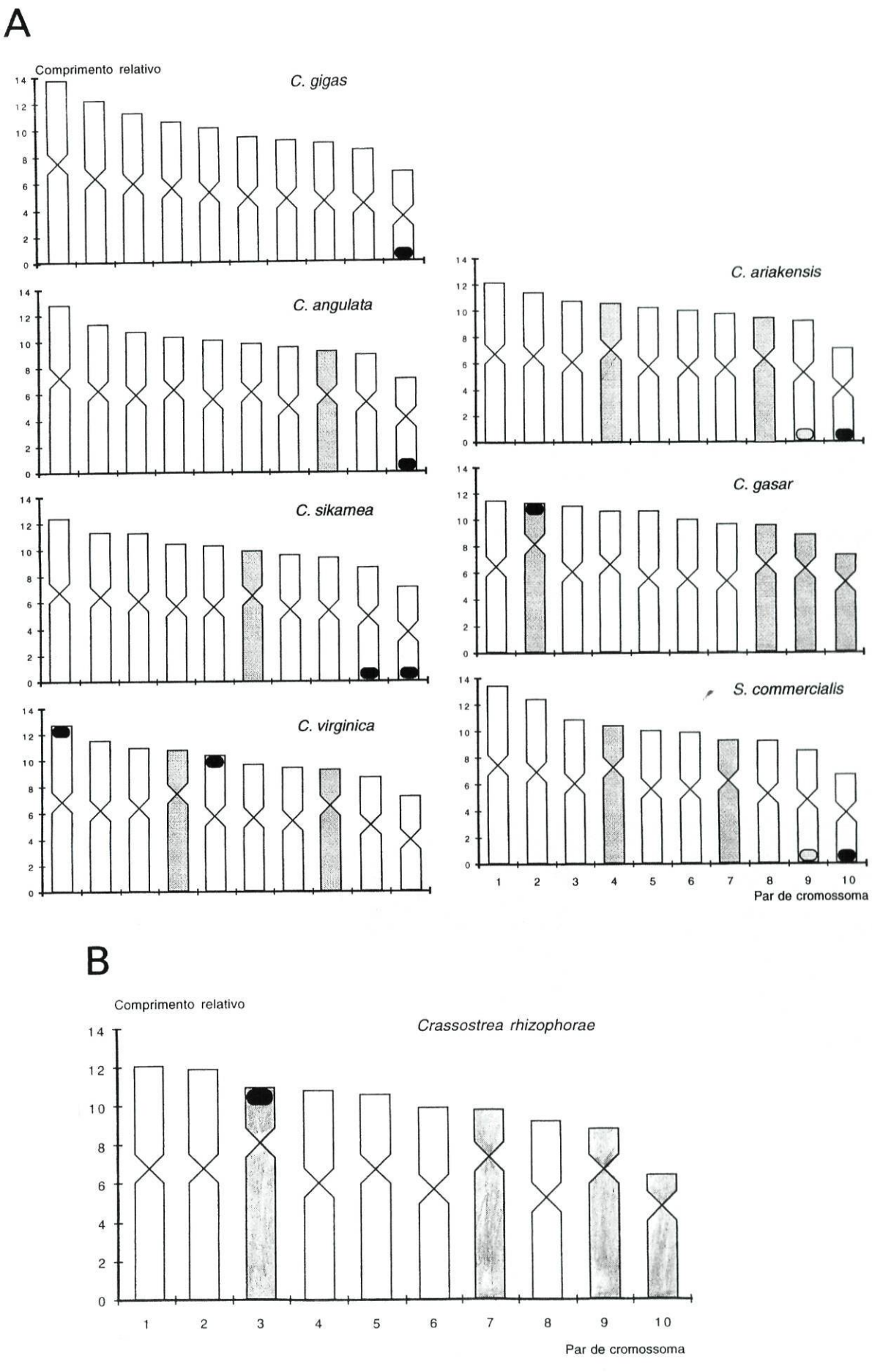


Figura 14: **A.** Ideograma representativo dos cariótipos de sete espécies de ostras rugosas, elaborado a partir dos valores do comprimento relativo e do índice centromérico de cada par de cromossomas, de cada uma das espécies (a partir da publicação Leitão et al, 1999). **B.** Ideograma representativo do cariótipo de *Crassostrea rhizophorae*, elaborado a partir dos valores do comprimento relativo e do índice centromérico de cada par de cromossomas. Cromossomas brancos: metacêntricos, cromossomas cinzentos: submetacêntricos. Os círculos indicam as Ag-NORs, os círculos pretos indicam o caso mais frequente.

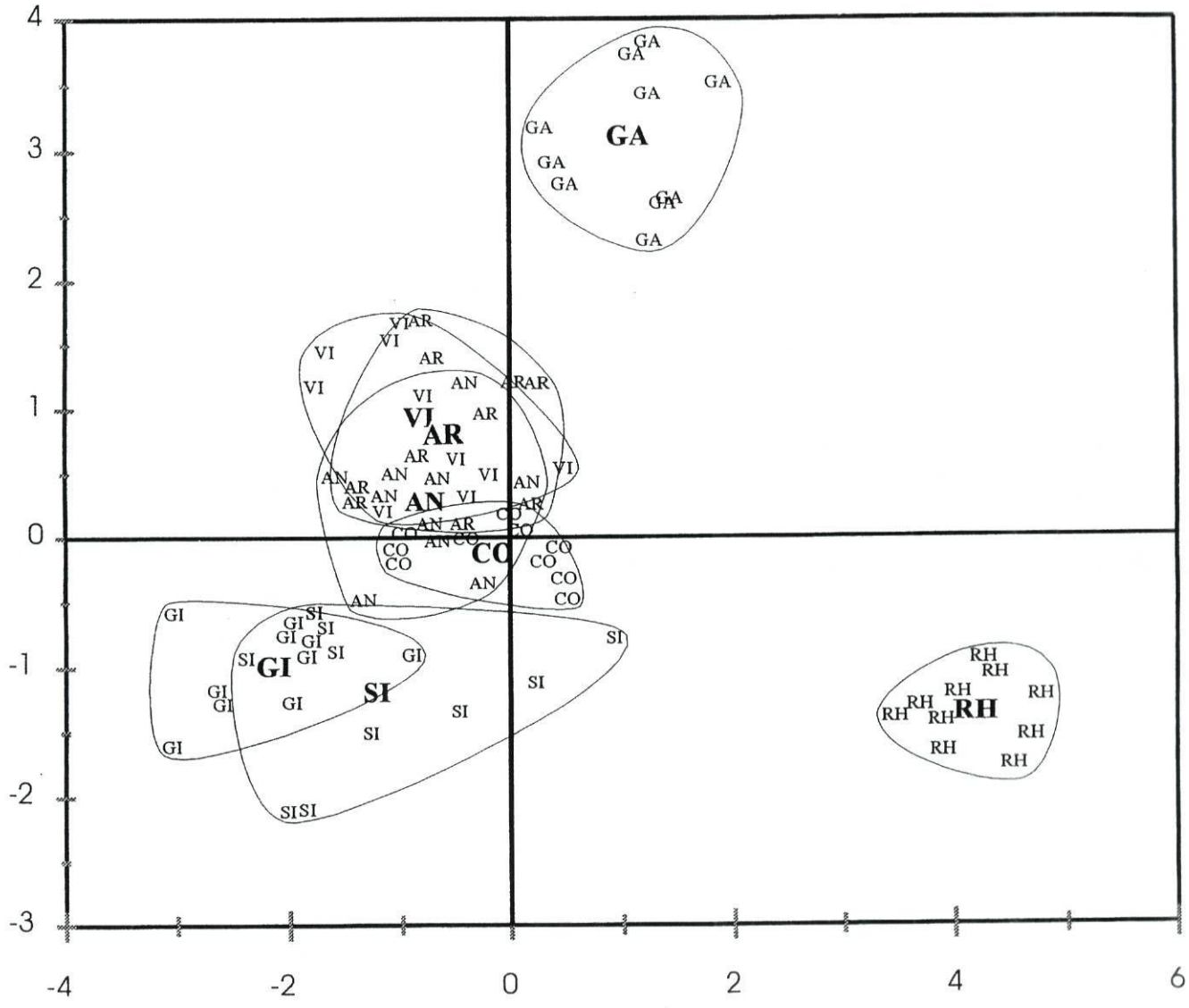


Figura 15: 1/2 plano determinado pelos dados da análise de componentes principais (PCA). Os caracteres pequenos representam cada metafase, os caracteres grandes a média das 10 metafases para cada espécie. Uma linha foi traçada à volta de cada espécie para mostrar a dispersão intraespecífica. **AN**: *Crassostrea angulata*, **CO**: *Saccostrea commercialis*, **GA**: *Crassostrea gasar*, **GI**: *Crassostrea gigas*, **AR**: *Crassostrea ariakensis*, **SI**: *Crassostrea sikamea*, **VI**: *Crassostrea virginica*, **RH**: *Crassostrea rhizophorae*.

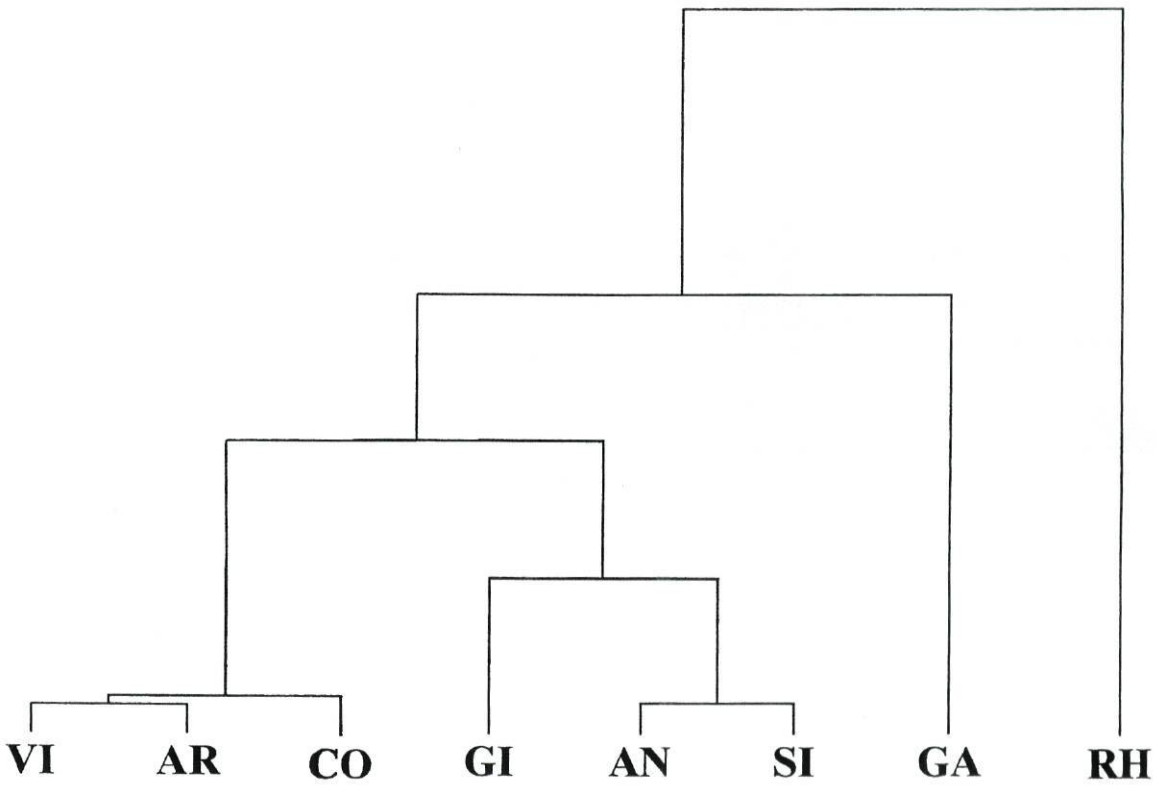


Figura 16: Análise ascendente hierárquica (HCA) que apresenta as diferenças entre a oito espécies de ostras rugosas, obtidas pelos quatro primeiros eixos da análise de componentes principais (PCA). **AN**: *Crassostrea angulata*, **CO**: *Saccostrea commercialis*, **GA**: *Crassostrea gasar*, **GI**: *Crassostrea gigas*, **AR**: *Crassostrea ariakensis*, **SI**: *Crassostrea sikamea*, **VI**: *Crassostrea virginica*, **RH**: *Crassostrea rhizophorae*.

distinguem depois, um que agrupa as espécies *Crassostrea virginica, Crassostrea ariakensis* e *Saccostrea commercialis* e um segundo com as três espécies *Crassostrea angulata, Crassostrea sikamea* e *Crassostrea gigas*, estando esta mais afastada. A Análise de componentes principais e a Classificação ascendente hierárquica foram realizadas com o software SPAD (CESIA) (Lebart *et al.*, 1995).

3. Localização da heterocromatina através do método das bandas C

Não obtivemos resultados positivos nas tentativas de aplicação desta técnica efectuadas nas espécies *Crassostrea gigas* e *Crassostrea virginica.*

Ostrea edulis

Foram observadas 66 metafases onde a aplicação da técnica das bandas C à espécie *Ostrea edulis*, foi realizada com sucesso (Figura 17).

A presença de bandas C centroméricas ou teloméricas foi observada nos pares cromossómicos nº 1, 4 e 10, em homo ou heterozigotia.

Quadro 8: Distribuição das Bandas C na espécie *Ostrea edulis*

Par nº	Posição da banda C	Percentagem observada homozigotia	heterozigotia
1	centromérica	0%	44%
4	centromérica	78%	22%
10	telomérica	22%	10%

4. Bandas G

O insucesso da aplicação do método de Seabright com a utilização da tripsina, foi provavelmente devido à especificidade desta enzima para as proteínas estruturais dos cromossomas dos mamíferos, onde esta técnica é utilizada por rotina.

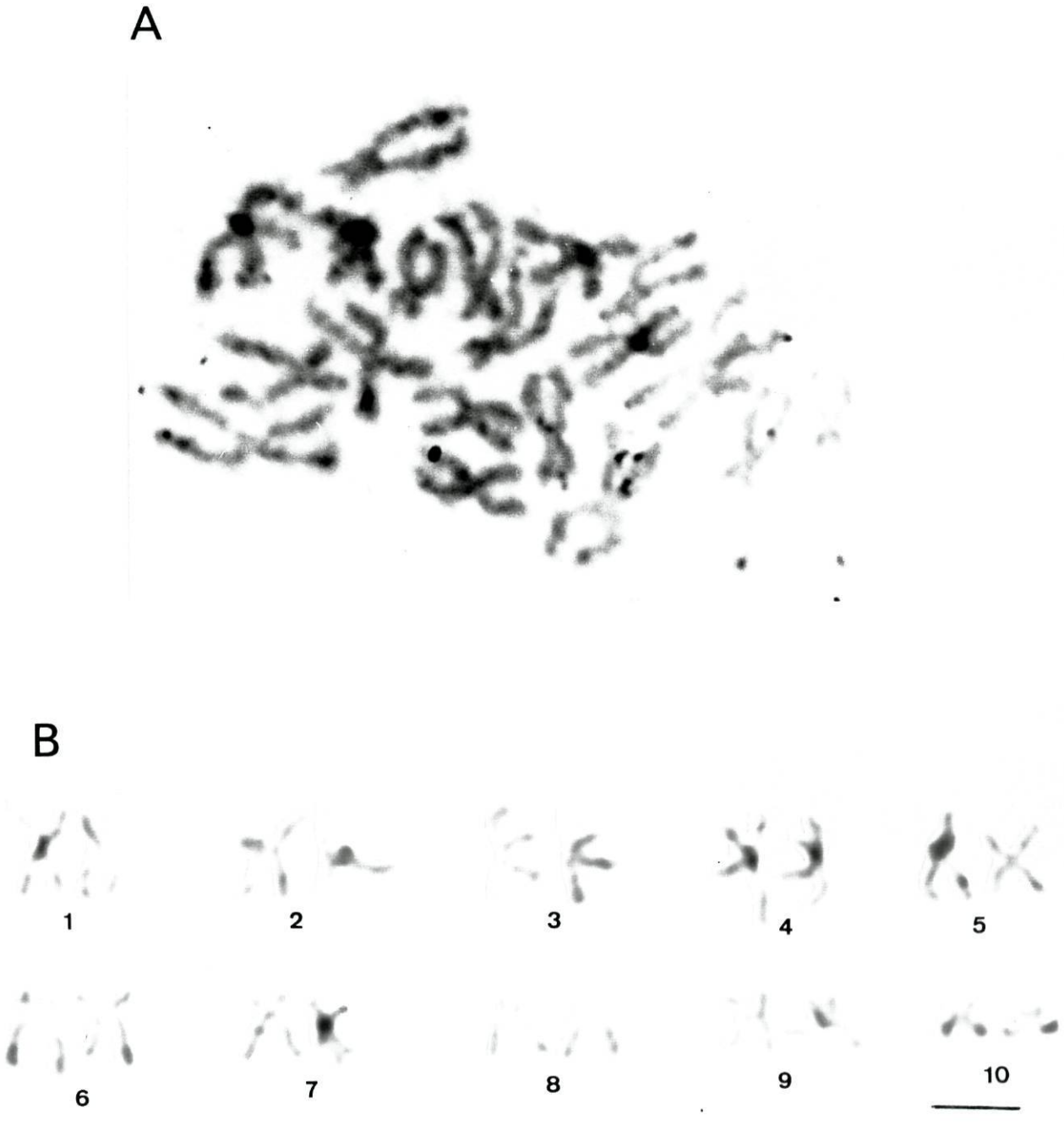


Figura 17: **A.** Metafase mitótica de *Ostrea edulis* submetida ao método das bandas C. **B.** Cariótipo de *Ostrea edulis* com bandas C, veja-se a presença de bandas C centroméricas nos pares nº1 e 4 e teloméricas no par nº10. Barra de escala=5μm.

Ostrea edulis

A aplicação do método ASG para a obtenção das bandas G à espécie *Ostrea edulis* neste estudo, permitiu a obtenção de um modelo preliminar de identificação dos cromossomas (Figura 18). O número de mitoses marcadas obtidas não foi, no entanto, suficiente para permitir a obtenção de um modelo definitivo.

Crassostrea gigas*, *Crassostrea angulata* e *Crassostrea virginica.

O estabelecimento de um padrão de bandas G exige a comparação de cromossomas que apresentem um grau de condensação semelhante. Apesar de termos observado um número muito elevado de metafases marcadas positivamente pelo método ASG, seleccionamos para interpretação apenas aquelas que apresentavam graus de condensação semelhantes (18 cariótipos em *Crassostrea gigas*, 20 cariótipos em *Crassostrea angulata* e 21 cariótipos em *Crassostrea virginica*).

A Figura 19 apresenta um exemplo de metafase de *Crassostrea gigas* com marcação pelas bandas G.

Na Figura 20, estão representados os cariótipos haplóides marcados pelas bandas G das três espécies. A representação de cariótipos haploides tem como função facilitar a comparação dos vários pares de cromossomas homólogos, entre as três espécies estudadas. Como foi visto anteriormente, o cariótipo de *C. gigas* é constituído por dez pares de cromossomas metacêntricos, o de *C. angulata* por 9 pares metacêntricos e um submetacêntrico (par n°8) e o de *C. virginica* é constituido por oito pares de cromossomas metacêntricos e 2 pares de cromossomas submetacêntricos (pares n° 4 e 8).

A Figura 21 apresenta uma representação esquemática do modelo em bandas G, obtido para as três espécies. Devido às diferenças de condensação dos cromossomas, apenas as principais bandas foram utilizadas na comparação das três espécies, dando-se uma maior ênfase ao número do que à posição destas:

Cromossoma 1: No braço curto, tanto *C. gigas* como *C. angulata* apresentam duas bandas major, enquanto que *C. virginica* apresenta quatro bandas major. No braço longo, todas as três espécies apresentam quatro bandas.

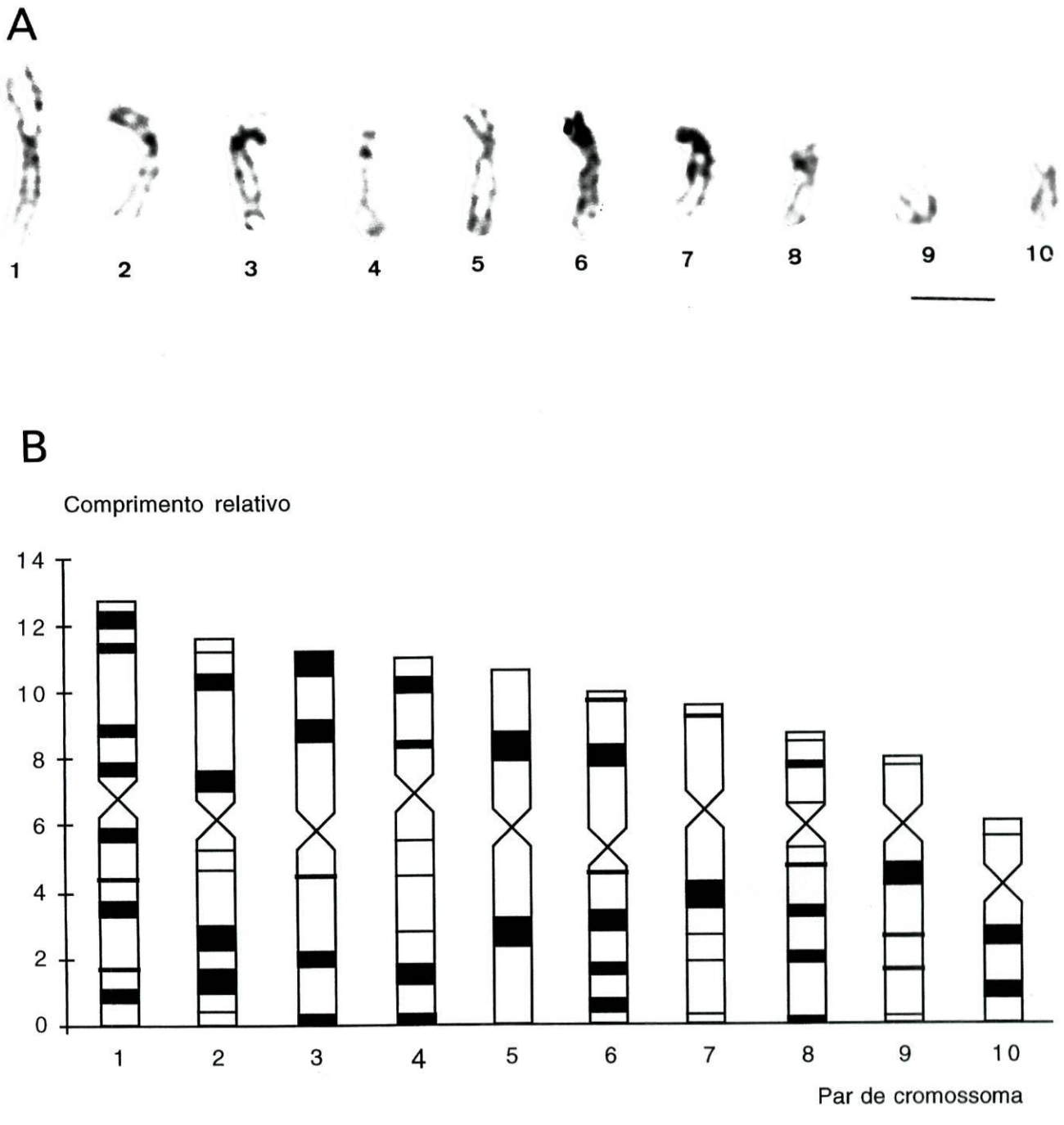


Figura 18: **A.** Cariótipo haploide de *Ostrea edulis* com marcação pelas bandas G; **B.** Modelo das principais bandas G desta espécie. Barra de escala=5μm.



Figura 19: Metafase de *Crassostrea gigas* com marcação pelas bandas G. Barra de escala=5µm.

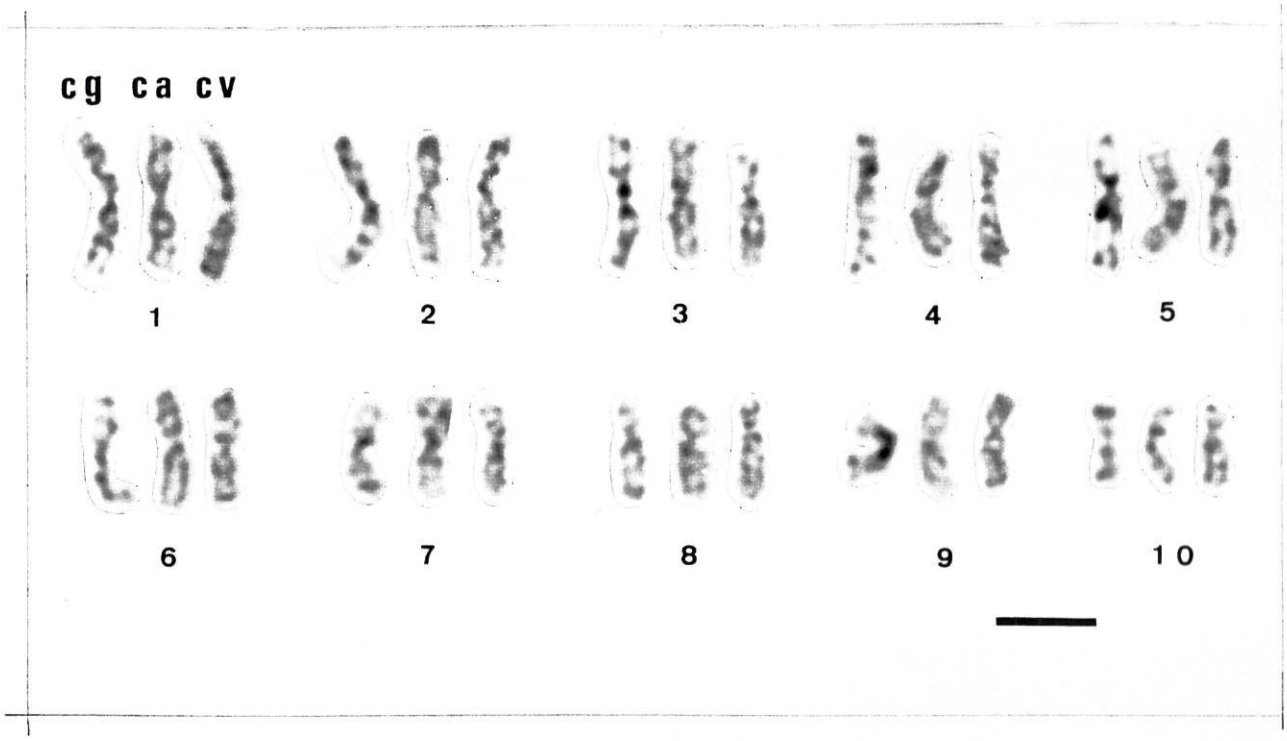


Figura 20: Cariótipos haploides com marcação pelas bandas G. Cg: *Crassostrea gigas*, Ca: *Crassostrea angulata*, Cv: *Crassostrea virginica*. Barra de escala=5µm.

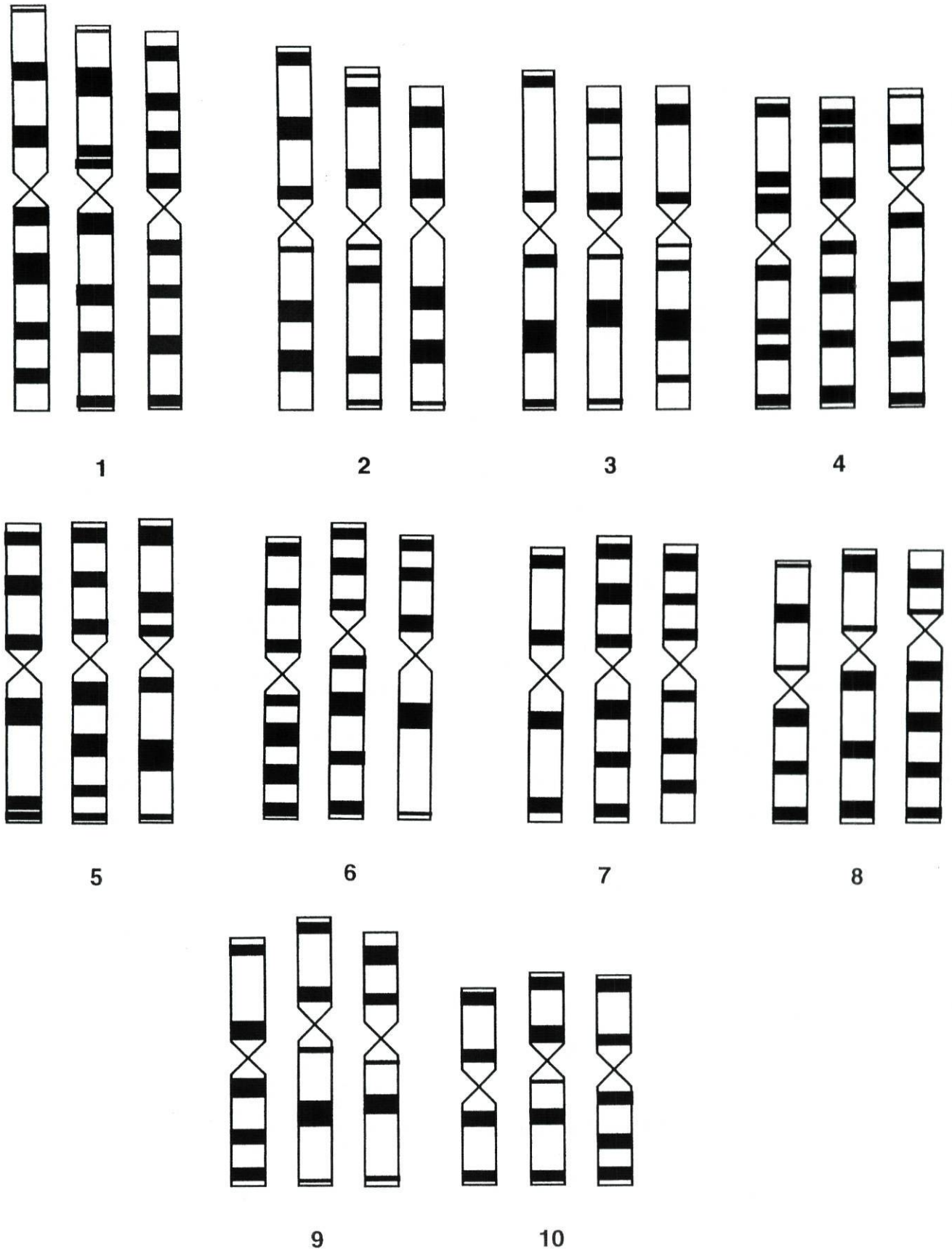


Figura 21: Ideograma comparativo dos modelos de bandas G das espécies *Crassostrea gigas* (Cg), *Crassostrea angulata* (Ca) e *Crassostrea virginica* (Cv).

Cromossoma 2: No braço curto, *C. gigas* apresenta três bandas, enquanto que *C. angulata* e *C.virginica* apresentam duas bandas major. As três espécies são caracterizadas pela presença de três bandas major no braço longo.

Cromossoma 3: O padrão das bandas G neste cromossoma é semelhante para as três espécies, sendo caracterizado pela presença de duas bandas major nas extremidades dos braços curtos e uma banda larga no centro do braço longo.

Cromossoma 4: No braço curto, nas espécies *C. gigas* e *C. angulata*, as bandas são observadas em posições subteloméricas e perto do centrómero, enquanto que *C. virginica* é caracterizada por uma única banda major, numa posição central. Quatro bandas estão presentes no braço longo das três espécies, diferindo ligeiramente na sua posição, o que é provavelmente devido a diferenças no grau de condensação.

Cromossoma 5: As três espécies apresentam três bandas no braço curto. No braço longo, o modelo em bandas G é diferente nas três espécies.

Cromossoma 6: No braço curto, podem ser observadas três bandas nas três espécies. No braço longo, *C. gigas* e *C. angulata* apresentam quatro bandas sucessivas, enquanto que o padrão de bandas G em *C. virginica* é caracterizado pela presença de uma banda major em posição mediana.

Cromossoma 7: *C. gigas* apresenta duas bandas no braço curto e duas no braço longo. Em *C. angulata* e *C. virginica*, três bandas podem ser vistas tanto no braço curto como no braço longo. Estas diferem ligeiramente na sua intensidade e posição.

Cromossoma 8: O braço curto das três espécies é caracterizado pela presença de uma banda major. Existem três bandas major nos braços longos de *C. gigas* e *C. angulata* e quatro no de *C. virginica*.

Cromossoma 9: No braço curto, estão presentes duas bandas nas três espécies. No braço longo, *C. gigas* apresenta três bandas de tamanho semelhante, enquanto que *C. angulata* e *C. virginica* são caracterizadas pela presença de uma banda major.

Cromossoma 10: As três espécies são caracterizadas por duas bandas nas extremidades do braço curto. Duas bandas major estão presentes nos braços longos de *C. gigas* e *C. angulata,* enquanto que três estão presentes em *C. virginica.*

5. Bandas R

Neste estudo, a aplicação desta técnica às espécies de ostras: *Ostrea edulis*, *Crassostrea gigas*, *Crassostrea angulata* e *Crassostrea virginica*, permitiu a obtenção de um modelo preliminar de identificação dos cromossomas (Figuras 22 A e B, 23 A e B, 24 A e B e 25 A e B). Este modelo parece ser complementar do modelo obtido pela aplicação, nas mesmas espécies, da técnica de obtenção das bandas G.

6. Hibridação *in situ*

1º ensaio - Junho 1997

Crassostrea virginica

Não se obtiveram resultados positivos neste ensaio, nenhuma mitose se encontrava marcada pela fluorescência. A única fluorescência observada foi a residual. Este insucesso pode ter sido devido à utilização de sondas não apropriadas para a espécie em estudo.

2º ensaio - Dezembro 1998

Crassostrea gigas

A observação ao microscópio de fluorescência permitiu-nos verificar a presença de marcação nos núcleos interfásicos existentes nas lâminas. Assim pudemos observar dois a quatro sinais (Figura 26), o que nos leva a colocar a hipótese de existirem dois pares de genes codificadores para a enzima amilase nesta espécie (nos casos de observação de menos de quatro sinais, estes devem estar provavelmente numa posição tal, que não sejam visíveis para o observador, como por exemplo se situarem na parte posterior do núcleo).

ICBAS

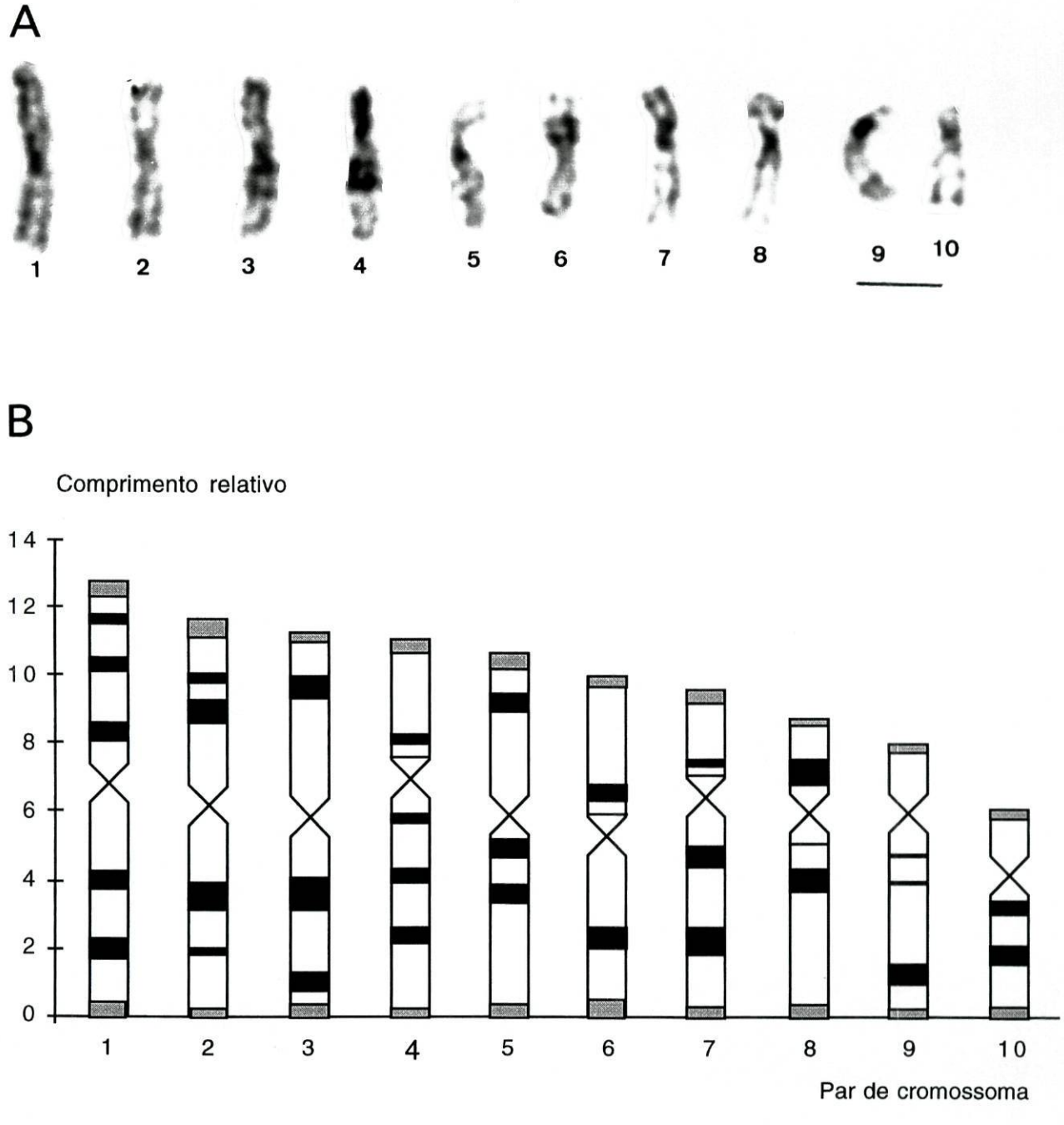


Figura 22: **A.** Cariótipo haploide de *Ostrea edulis* com marcação pelas bandas R; **B.** Modelo das principais bandas R desta espécie. Barra de escala=5μm.

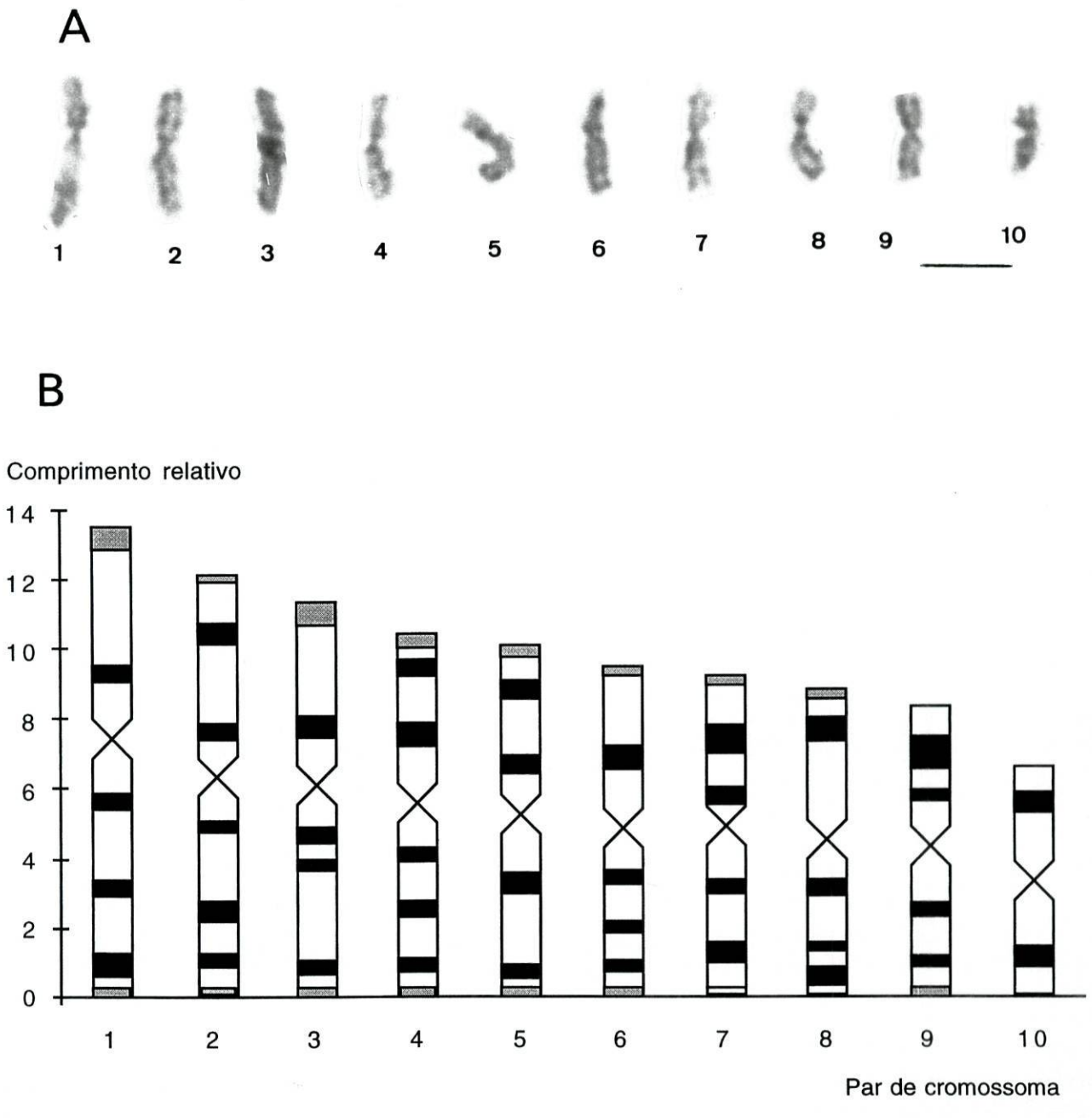


Figura 23: **A.** Cariótipo haploide de *Crassostrea gigas* com marcação pelas bandas R; **B.** Modelo das principais bandas R desta espécie. Barra de escala=5μm.

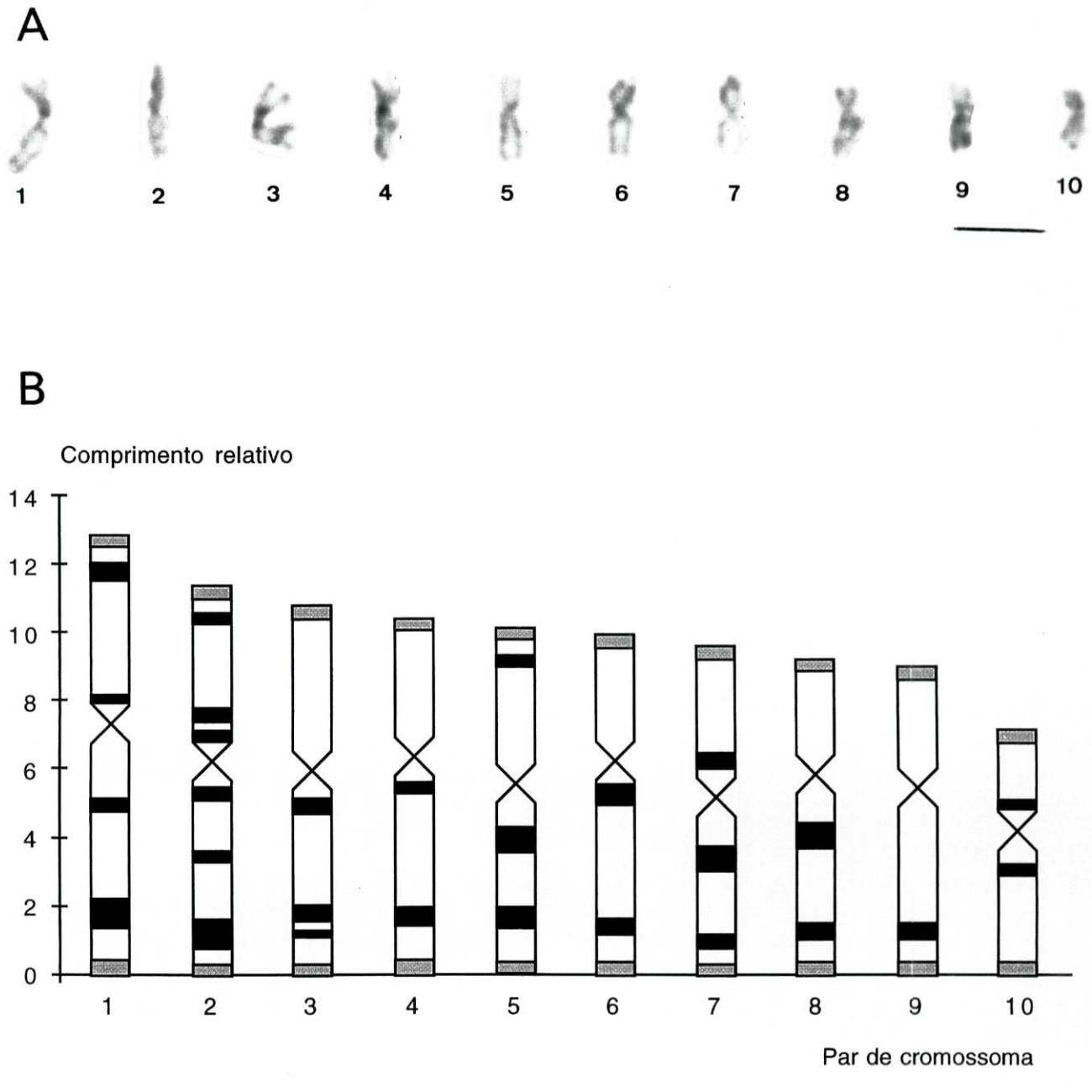


Figura 24: **A.** Cariótipo haploide de *Crassostrea angulata* com marcação pelas bandas R; **B.** Modelo das principais bandas R desta espécie. Barra de escala=5μm.

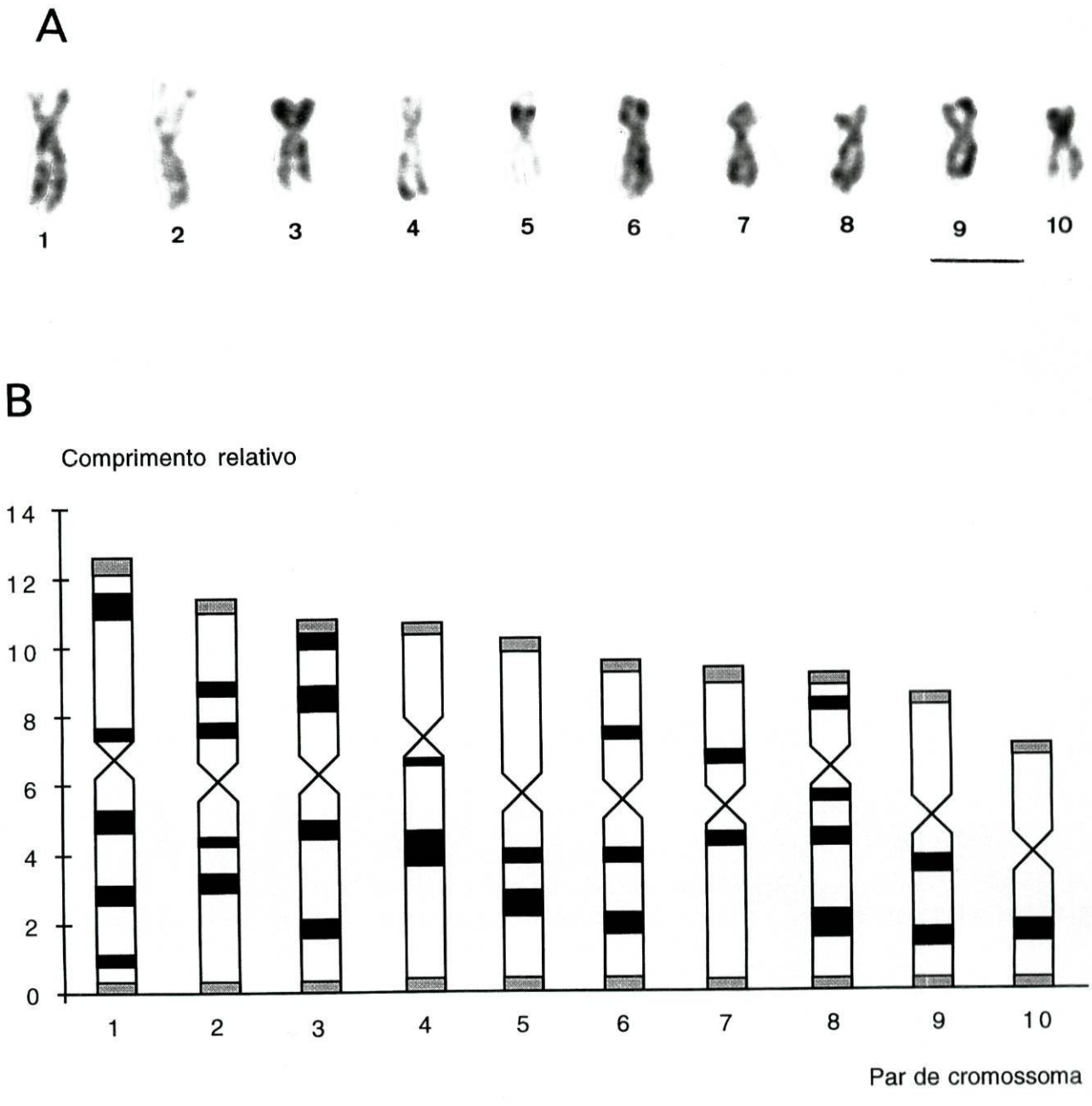


Figura 25: **A.** Cariótipo haploide de *Crassostrea virginica* com marcação pelas bandas R; **B.** Modelo das principais bandas R desta espécie. Barra de escala=5μm.

Os cromossomas encontravam-se excessivamente desnaturados. Consideramos que estes resultados prévios são muito interessantes, e pretendemos realizar uma nova experiência, em colaboração com a Dr. Raquel Chaves. Nessa experiência, fazer-se-há uma readaptação do protocolo, que reduza a excessiva desnaturação dos cromossomas, para que seja possível obter uma marcação positiva dos cromossomas em metafase e confirmação da hipótese acima colocada.

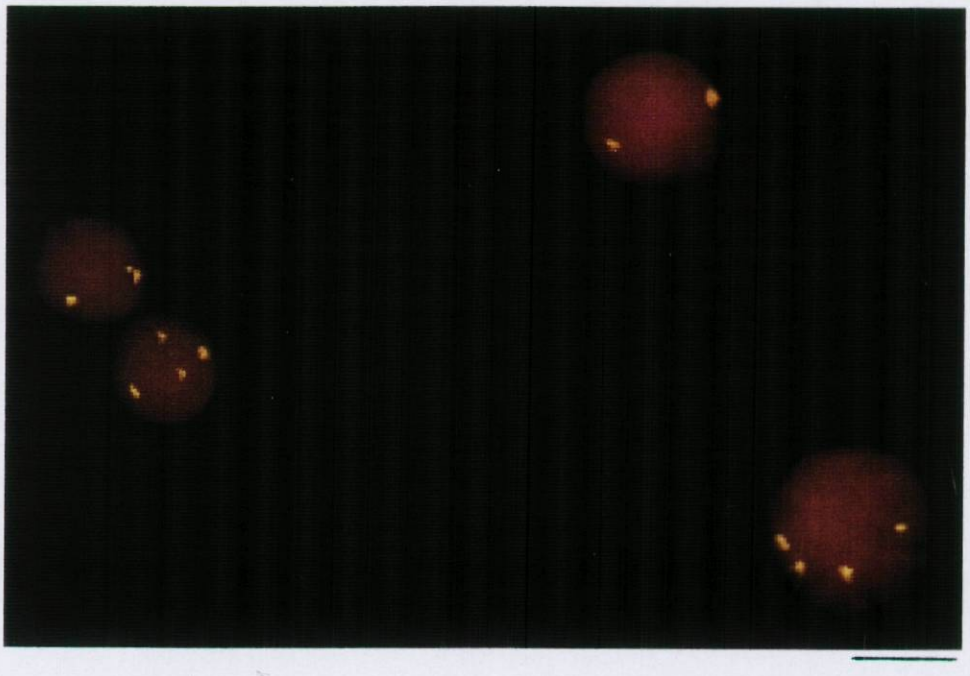


Figura 26: Hibridação *in situ* por fluorescência em núcleos interfásicos de *Crassostrea gigas*. Barra de escala=10µm.

Discussão

O número diploide 2n=20 cromossomas foi confirmado para todas as espécies de ostras estudadas.

O cariótipo padrão foi aqui estabelecido, pela primeira vez, para as espécies *Crassostrea ariakensis*, *Crassostrea gasar*, *Crassostrea sikamea* e *Saccostrea commercialis*. Os cariótipos *de Crassostrea gigas*, *Crassostrea angulata, Crassostrea virginica, Crassostrea rhizophorae*, e *Ostrea edulis* foram re-examinados, a fim de se poder comparar a morfologia dos cromossomas, obtida com a mesma técnica e pelo mesmo manipulador.

1. Análise cariométrica

As medições cromossómicas efectuadas nas espécies *Crassostrea gigas* e *Ostrea edulis,* populações provenientes de la Tremblade (França) utilizadas neste estudo, mostraram que os valores médios do comprimento relativo e do índice centromérico são iguais aos obtidos anteriormente em *Crassostrea gigas*, e semelhantes aos encontrados na espécies *Ostrea edulis* (Thiriot-Quiévreux, 1984). Nesta ultima espécie as diferenças encontram-se a nível dos pares nº4 e 6.

A analise cromossómica comparativa de 3 diferentes populações de *Ostrea edulis*: população de la Tremblade, população de Sete e população de Barfleur, mostrou uma grande homogeneidade entre os cariótipos. A comparação dos valores do índice centromérico das populações estudados, colocou em evidência a uniformidade dos pares de cromossomas nº1, 2, 3, 5, 7 e 10. Foi nos pares 6, 8 e 9 que observámos ligeiras variações na posição do centrómero sem que haja, no entanto, alteração no número final de cromossomas metacêntricos e submetacêntricos, confirmando-se a fórmula do cariótipo na espécie *Ostrea edulis*. Resultados similares tinham já sido obtidos em outras populações de *Ostrea edulis* (Thiriot-Quiévreux, 1984).

O cariótipo da espécie *Crassostrea angulata* obtido, difere do descrito para animais desta espécie criados em Barfleur (Thiriot-Quiévreux, 1984). Esta diferença pode ser devida à origem dos animais. As amostras utilizadas neste estudo são originárias da baía de Setúbal (Portugal) e foram consideradas como *C. angulata* puras (Boudry *et al.*, 1998). A origem das amostras do estudo de Barfleur é desconhecida.

O cariótipo de *C. virginica,* estabelecido neste estudo com dois pares de cromossomas submetacêntricos, difere dos descritos por Longwell *et al.*, (1967) e Rodriguez-Romero (1978), os quais apresentam quatro pares de cromosomas submetacêntricos. No entanto, a posição destes quatro pares de cromossomas no cariótipo difere naqueles dois autores. Foi observada uma discontinuidade genética nesta ostra americana ao longo da costa Atlântica e do golfo do México (Buroker, 1983; Reeb e Avise, 1990; Hare e Avise, 1996). A origem dos animais estudados neste trabalho, é próxima da dos animais estudados por Longwell *et al.*, (1967). Logo, a variação cariologica observada pode ser causada por diferenças no acondicionamento dos animais ou na técnica utilizada (*e.g.* diferentes concentrações de colquicina, que foi de 0,02% em Longwell *et al.*, 1967 e 0,005% neste estudo).

O cariótipo de C. *rhizophorae* aqui estabelecido, obtido a partir de animais provenientes da Guyana Francesa, apresenta 4 pares de cromossomas submetacêntricos. Estes resultados diferem dos descritos por Rodriguez-Romero *et al.*, (1979) e mais tarde por Ladron de Guevara *et al.*, (1996), em animais originários do México, os quais apresentam cinco pares de cromossomas metacêntricos, e daquele descrito por Marquez (1982), em animais provenientes da Venezuela, que apresenta dois pares de cromossomas submetacêntricos. Esta variação pode ser devida: (I) á aclimatação, (II) ás diferenças na técnica utilizada, como descrito previamente para *C. virginica*, (II) à possibilidade de que os animais aqui estudados não pertençam à espécie classicamente identificada como *C. rhizophorae*. De facto, ao contrário de *C. virginica* que possui uma repartição bem conhecida e que foi já estudada genéticamente em vários locais, a posição de *C. rhizophorae* ainda não se encontra bem estabelecida. Ainda em 1985, Harry sugeria que *C. rhizophorae* não era mais do que uma sub-espécie de *C. virginica*.

A analise cariológica das oito espécies de ostras rugosas estudadas, efectuada por Análise de componentes principais (PCA) e Classificação ascendente hierárquica (HCA), colocou em evidência o isolamento de *C. gasar* e de *C. rhizophorae* (origem, Guyane Francesa). Esta proximidade cariológica foi uma surpresa, na medida em que estas espécies são muito diferentes a nível morfológico. Uma hipótese que pode ser formulada para explicar esta semelhança entre *Crassostrea gasar* originária do Senegal e *Crassostrea rhizophorae* originária da Guyane francesa, diz respeito ao facto de ambas origens serem duas ex-colónias francesas. Pode pensar-se que houve um

transporte (p.ex. num barco) de uma das duas espécies de um lugar para o outro, e que as diferenças fenotípicas observadas correspondam a adaptações da espécie transportada ao novo meio ambiente. Estudos de citogenética e de genética molecular poderiam inferir sobre as semelhanças destas duas espécies e de espécies vizinhas em ambos locais de origem, para permitir prever qual das duas espécies foi a transportada, logo qual a mais antiga.

Depois do isolamento de *C. gasar* e de *C. rhizophorae*, dois novos grupos se separam. O primeiro é constituído por *C. gigas*, *C. angulata* e *C. sikamea*. *C. gigas,* que apresenta o cariotipo mais simétrico, poderá ser considerada como plesiomórfica. *C. gigas* e *C. angulata* foram durante muito tempo consideradas como a mesma espécie (Menzel, 1974), da mesma forma que *C. gigas* e *C. sikamea*, sendo a última várias vezes considerada como a variedade Kumamoto de *C. gigas* (Ahmed, 1973). Estudos recentes de genética molecular colocaram em evidência as diferenças entre *C. gigas e C. sikamea* (Banks *et al.*, 1994) e entre *C. gigas* e *C. angulata* (Boudry *et al.*, 1998; O'Foighil *et al.*, 1998). Os resultados do estudo cariológico aqui efectuado confirmam essas diferenças genéticas.

O segundo grupo agrupa as espécies *C. ariakensis*, *C. virginica* e *Saccostrea commercialis*. Através de estudos de filogenia das ostras rugosas, Littlewood (1994), colocou em evidência duas linhagens*:* *C. gigas, C. belcheri, C. rivularis* e *C. virginica, C. rhizophorae* e *S. commercialis*.

O'Foighil *et al.*, (1995) utilizaram sequências de gene ribossomal mitocondrial 16S para confirmar a divergência genética entre *C. virginica*, e as duas congéneres asiáticas*: C. gigas* e *C. ariakensis*. Ladron de Guevara *et al.* (1996) sugeriram que *C. virginica* apresenta cacterísticas cariologicas mais primitivas que *C. rhizophorae* e *C. cortiziensis*.

Os nossos resultados estão de acordo com a relação entre *C. virginica* e *S. commercialis*, mas não com a posição de *C. ariakensis*.

Pelo exposto se pode verificar que a análise cariométrica permite precisar a morfologia cromossómica, e de efectuar comparações através de métodos estatísticos. As técnicas de marcação por bandas, por seu lado, mostraram ser muito úteis na identificação individual dos cromossomas e, também, na identificação de regiões particulares destes, complementando os conhecimentos adquiridas pela análise cariométrica.

2. Análise das marcações cromossómicas

Ag-NORs

O número de Ag-NORs, a sua localização e a sua posição no cariótipo, podem ser consideradas como características específicas de uma espécie (Sumner, 1990).

Os nossos resultados referentes á localização das Ag-NORs são originais para as espécies *C. virginica*, *C. angulata*, *C. sikamea*. *C. ariakensis*, *C. gasar*, *C. rhizophorae* e *S. commercialis*.

A presença de uma Ag-NOR em homo ou heterozigotia no par nº10 da espécie *C. gigas*, observada por Thiriot-Quiévreux e Insua (1992), foi aqui confirmada.

Em *C. virginica*, Longwell e Stiles (1996) sugeriram que as NORs poderiam estar localizadas na constrição secundária observada no maior par de cromossomas metacêntricos. Os resultados aqui obtidos confirmam a localização de Ag-NORs no par nº1, e uma outra Ag-NOR foi observado no par nº5.

O heteromorfismo, aqui observado, na actividade e no tamanho das Ag-NORs é um fenómeno comum nos bivalves (Thiriot-Quiévreux e Insua, 1992; Insua *et al.*, 1994; Martinez-Exposito *et al.*, 1994).

A presença das Ag-NORs em heterozigotia pode ser explicada pelo facto da técnica marcar apenas as regiões dos organizadores nucleolares que estiveram activas na interfase precedente à metafase estudada (Miller *et al.*, 1976). No entanto, o conceito de "NOR activa" varia entre os vários autores (Medina *et al.*, 1986). Para uns esta actividade está directamente relacionada com actividade transcriptional efectiva do DNA, para outros é equivalente a actividade potencial, ou seja, a cromatina que se encontra descondensada pode vir a transcrever na próxima interfase ou ter estado activa na precedente (Hernandez-Verdun *et al.*, 1982).

Neste estudo, a maior parte das espécies de ostras apresentaram as Ag-NORs nos braços longos do par nº9 ou nos pares nº9 e nº10, variando a frequência de uma espécie à outra. No entanto, a posição das Ag-NORs nos cromossomas de *C. gasar* (nos braços curtos do par nº2), *C. rhizophorae* (nos braços curtos do par nº3) e *C. virginica* (nos braços curtos dos pares nº1 e 5) distingue-as claramente das outras espécies.

A posição das NORs permitiu a separação de *C. angulata* (par nº10) e *C. sikamea* (pares nº 9 e 10) e de *C. virginica* (pares nº 1 e 5) e *C. ariakensis* (pares nº 9 e 10), que apresentam cariótipos semelhantes.

A localização das Ag- NORs, observada em homo ou heterozigotia nos pares nº9 e nº10 em *Ostrea edulis*, confirma os resultados obtidos por Thiriot-Quiévreux e Insua (1992). Nós observámos, no entanto, um par suplementar, par nº7, com Ag-NOR na extremidade do braço longo em homo ou heterozigotia.

A comparação do modelo de localização das Ag-NORs em *Ostrea edulis* com as outras espécies de ostras planas (chatas) *Ostrea puelchana*, *Ostrea denselamellosa*, *Ostrea angasi* e *Tiostrea chilensis,* mostra que a sua localização varia entre estas cinco espécies. Estas regiões encontram-se na extremidade do braço curto dos pares 2 e 4 em *O. puelchana* (Insua e Thiriot-Quiévreux, 1993); na extremidade dos braços curtos dos pares 3 e 8 em *O. denselamellosa* (Insua e Thiriot-Quiévreux, 1991), na extremidade do braço longo dos pares 9 e 10 e esporadicamente no par nº3 na espécies *O. angasi* (Li e Havenhand, 1997*)*, e nos braços longos dos pares nº2 e nº9 em *T. chilensis* (Ladron de Guevara *et al.*, 1994).

O cariótipo e o modelo Ag-NOR da espécies *Ostrea puelchana* permite a separação desta espécie das outras ostras planas (chatas), o que segundo Harry (1985) poderia servir como argumento citotaxonómico para a subdivisão do género *Ostrea* em dois sub-géneros: *Ostrea ss* e *Eostrea.*

O Quadro 9, apresenta um resumo dos resultados obtidos neste estudo, no que diz respeito ao estabelecimento dos cariótipos e á localização dos organizadores nucleolares nas 9 espécies de ostras estudadas.

Quadro 9: Resumo dos dados cariológicos obtidos nas 9 espécies de ostras estudadas.

Espécies	2n	Tipo de cromossomas (par cromossómico nº) m	sm	Nº de (haploide) cromossomas com NOR
C. gigas	20	10	0	1 (par 10)
C. angulata	20	9	1	1 (par 10)
C. sikamea	20	9	1	2 (pares 9 e 10)
C. virginica	20	8	2	2 (pares 1 e 5)
C. ariakensis	20	8	2	2 (pares 9 e 10)
C. gasar	20	6	4	1 (par 2)
C. rhizophorae	20	6	4	1 (par 3)
S. commerciallis	20	8	2	2 (pares 9 e 10)
O. edulis	20	5	5	3(pares 7, 9 e 10)

Bandas C

As bandas C surgem, após coloração adequada, nas regiões heterocromáticas (centrómeros, telómeros e nas regiões adjacentes às constrições secundárias) dos cromossomas, podendo ser úteis como marcadores para a comparação intra e inter específica dos cariótipos (John, 1988; Sumner, 1990).

No género *Ostrea*, duas espécies foram estudadas, até ao momento, pelo método das bandas C: *O. denselamellosa* (Insua e Thiriot-Quiévreux, 1991) e *O. angasi* (Li e Havenhad, 1997). Em *Ostrea denselamellosa*, as bandas C foram sempre observadas na região centromérica dos pares nº6, 7, 8, 9 e 10. Outros blocos heterocromáticos foram observados no par nº2 em 47% dos cariótipos estudados e no par nº5 em 30% dos casos. Foi observada, por vezes, hetrocromatina em posição terminal nos pares 3, 5, 6, 8, 9, e 10. Na espécie *O. angasi*, a heterocromatina foi sempre observada na posição centromérica, nos pares 3, 6, 8, 9, e 10. Outras bandas foram observadas nos pares 4 e 7 em 40% e 20% dos cariótipos estudados.

Na espécies *Ostrea edulis*, encontramos bandas C teloméricas (par nº10) ou centroméricas (par nº4), em homo ou em heterozigotia. Uma banda C centromérica foi também encontrada, sempre em heterozigotia, no par nº1.

Segundo MacGregor e Sessions (1986), os centrómeros são locais de iniciação das bandas C e a transferência da heterocromatina é efectuada posteriormente para os telómeros. Logo os cariótipos com mais heterocromatina telomérica, seriam os mais antigos filogenéticamente. De acordo com esta teoria, os nossos resultados permitem-nos sugerir que a espécie *O. denselamellosa* seria mais antiga do que as espécies *O. edulis* e *O. angasi.*

A presença na espécie *Ostrea edulis* aqui estudada, de uma banda C no par nº1, sempre em heterozigotia, poderá ser explicada pela ausência real desta banda num dos cromossomas deste par, ou pela presença de um heteromorfismo. Este traduz-se numa variação do tamanho e a sua presença é característica nas regiões heterocromáticas (*e.g.* Verma 1988, 1990). O heteromorfismo pode estar relacionado com o conceito da inércia da heterocromatina, o que tornaria possível ao genoma flutuações substanciais de tamanho e de composição de alguns dos seus componentes (Sumner, 1990).

Atendendo à definição de heteromorfismo, a ausência de uma banda C num dos cromossomas do par nº1 poderia ser aparente, tratando-se antes da presença de uma banda C cujo tamanho reduzido não permita a sua detecção ao microscopio óptico, por se encontrar no limiar do poder de resolução deste, resultando daqui uma conclusão errónea.

Em nenhuma espécie de bivalves, até ao momento, foram observados cromossomas sexuais diferenciados. No entanto, o papel das bandas C heterocromáticas na diferenciação sexual foi observada em vários organismos vertebrados e invertebrados. Essas espécies que não possuem cromossomas sexuais diferenciados, apresentam, por vezes, um dismorfismo da cromatina sexual (bandas C heterocromáticas), (Bull, 1983), o que torna possível a atribuição de um sexo aos individuos, com base nessas regiões (*e.g.* Haaf e Schmid, 1984).

Há, porém, evidencia que este dimorfismo não está directamente relacionado com o processo de determinação sexual. Parece antes ser um reflexo dos diferentes graus de algumas actividades celulares fundamentais, provavelmente a síntese rRNA, entre os sexos (Dixon e McFadzen, 1987). No caso de se confirmar o heteromorfismo no par nº 1 em *Ostrea edulis*, este poderia representar um esboço de diferenciação sexual nesta espécie.

A aplicação da técnica das bandas C às espécies *Crassostrea gigas* e *Crassostrea virginica* não forneceu resultados conclusivos.

Nos bivalves, particularmente no género *Crassostrea*, a grande variabilidade observada nas bandas C intra e inter específica, para a qual contribuem em grande parte os factores técnicos (Sumner, 1990), e a dificuldade de obter metafases abundantes parecem ser os factores limitantes na aplicação desta técnica. Aliás, não existe nenhuma referência bibliográfica de uma aplicação desta técnica, efectuada com sucesso, na espécie *C. gigas* a qual, dada a sua grande distribuição geográfica e importância económica, foi já alvo de vários estudos de citogenética.

Localização simultânea das NOR e das bandas C

Trabalhos efectuados em cromossomas humanos ao microscópio electrónico mostraram que as NORs não são teloméricas, encontram-se rodeadas por zonas heterocromáticas, que parecem ter um papel de protecção da região do rDNA (Malheiro 1989). O mesmo foi já observado em cromossomas portadores de NORs em plantas.

A aplicação do método das bandas C, neste trabalho, aos cromossomas da espécie *O . edulis*, mostrou regiões C positivas nos telómeros do braço longo do par n°10, que tinha corado positivamente pelo método das Ag-NORs.

Um comportamento semelhante nos modelos de localização das bandas C e das Ag-NORs foi observado também nos vertebrados inferiores, como nos peixes: *Poecilia latipinna* (Sola *et al.*, 1990) e em *Leuciscus borysthenicus* (Rab *et al.*, 1996).

Também nos bivalves do género *Mytillus* se encontrou evidência de que as regiões hetrocromáticas são os sítios de localização das NORs (Dixon e McFadzen, 1987; Insua *et al.*, 1994; Martinez-Exposito *et al.*, 1994; Martinez-Lage *et al.*, 1995; Pasantes *et al.*, 1996).

A existência destas regiões, onde podemos observar em simultanêo as NORs e heterocromatina, pode ser explicada pelo papel desta última na organização dos cromossomas, promovendo a estabilidade dos telómeros e a protecção das NORs durante a mitose e a meiose (Miklos e John, 1979).

BandasG

Um dos maiores problemas da caracterização cromossómica das ostras está associado à dificuldade na identificação individual de todos os pares de cromossomas homólogos.

A aplicação da técnica de marcação pelas bandas G ás três espécies de ostras, *C. gigas*, *C. angulata* e *C. virginica*, permitiu a identificação individual dos cromossomas destas espécies, logo a possibilidade de precisar os respectivos cariótipos.

As principais bandas destas três espécies de *Crassostrea* apresentam um modelo similar nos braços curtos dos cromossomas 3, 8, 9, e 10 e nos braços longos dos cromossomas 1, 2, 3 e 4.

A comparação do nosso modelo de bandas G da espécie *C. virginica* com o modelo obtido anteriormente por Rodriguez Romero *et al.*, 1979, mostrou que este é

semelhante no que diz respeito às principais bandas dos pares nº 5 e 9, mas muito diferente para os restantes. Esta diferença observada entre os dois modelos pode ser explicada: (I) pelos diferentes cariótipos usados como padrões das 2 populações de *C. virginica* estudadas por análise cariométrica; (II) pela utilização de diferentes técnicas para a obtenção das bandas G; (III) por diferentes graus de condensação dos cromossomas.

C. gigas e *C. angulata* foram durante muito tempo consideradas como a mesma espécie (Menzel, 1974). Recentemente, porém, foram diferenciadas através de análise do mtDNA RFLP (Boudry *et al.*, 1998). O modelo em bandas G coloca em evidência a similaridade entre estas duas espécies, excepto no que diz respeito ao cromossoma nº7, ao braço longo dos cromossomas 5 e 9, e o braço curto do par nº2, que permitem a sua distinção cariológica. Isto corrobora os nossos resultados anteriores (cf. PCA e HCA).

Divergências genéticas entre *C. gigas* e *C. virginica* foram demonstradas por estudos de filogenia molecular (Litlewood, 1994; O'Foighil *et al.*, 1995), e por análise cariológica e marcação das NORs, neste estudo. As diferenças observadas entre o modelo de bandas G de *C. gigas* e *C. virginica* confirmam as suas diferenças genéticas.

Assim, a análise dos cariótipos marcados pela técnica das bandas G destas três espécies permite-nos afirmar que elas se assemelham, tendo mesmo um par de cromossomas idêntico nas três, o par nº3, e que as diferenças observadas entre elas mostram que há uma maior semelhança entre os cariótipos *C. gigas* e *C. angulata* do que entre os cariótipos de estas duas espécies e o de *C. virginica*. Estes dados confirmam tudo o que tem sido descrito na bibliografia quanto à posição filogenética destas três espécies.

A aplicação das bandas G à espécies *Ostrea edulis* neste estudo, permitiu a obtenção de um modelo preliminar de identificação dos cromossomas, uma vez que o número obtido de mitoses marcadas positivamente não foi suficiente para permitir a obtenção de um modelo definitivo.

Bandas R

Até ao momento, não encontrei quaisquer referências da aplicação do método para obtenção das bandas R aos cromossomas dos moluscos.

Neste estudo, a aplicação desta técnica às espécies de ostras, *Crassostrea gigas*, *Crassostrea angulata*, *Crassostrea virginica* e *Ostrea edulis*, permitiu a obtenção de um primeiro modelo de identificação dos cromossomas. Este modelo é complementar do modelo obtido pela aplicação, nas mesmas espécies, da técnica de marcação pelas bandas G.

Com efeito, as bandas R parecem estar posicionadas nos locais não marcados pelas bandas G, ou seja, que as R positivas correspondem ás G negativas. Também este modelo é preliminar uma vez que o número de mitoses marcadas não foi suficiente para permitir a obtenção de um modelo definitivo. No entanto, neste trabalho tanto no caso das bandas G como nas R, embora o número de mitoses seja pequeno, a marcação dos cromossomas é clara.

A aplicação simultânea destas duas técnicas de marcação cromossómica (bandas G e bandas R) às diferentes espécies de ostras, permitirá precisar a identificação individual de cada par de cromossomas.

3. Cromossoma supranumerário – População de Argenton

Numa população de *Crassostrea gigas,* em 2 dos 11 animais estudados (população de Argenton, cf.resultados) foi observada a presença de uma hiperdiploidia (aneuploidia por ganho de cromossomas). Este fenómeno nunca tinha sido descrito na espécie *C. gigas*.

Para estudarmos a hipótese de se tratar de uma trissomia do cromossoma 10, procedemos à marcação das NORs, dado que este é o único par que é portador destas regiões, nesta espécie. Mas a hipótese não pôde ser confirmada, visto neste par a presença das NOR se observar em homo ou heterozigotia e em nenhum dos cariótipos efectuados ter sido possível observar três cromosomas marcados.

Outra hipótese que nos parece provável é a de estarmos perante um cromossoma supra numerário ou cromossoma B. Os cromossomas B podem ser definidos como: "supranumerários prescindíveis, sem homólogo em nenhum membro do complemento básico, e que apresentam um sistema de transmissão hereditária irregular e não mendeliana" (Jones e Puertas, 1995). A terceira condição, no entanto, só nos seria possível averiguar, com o estudo dos descendentes destes dois animais.

A origem dos cromossomas B ainda não é bem conhecida, mas provavelmente têm origens diversas (Jones et Puertas, 1995). Isto pode justificar, no nosso caso, a presença dos dois tipos de cromossomas B: um cromossoma supranumerário de grande tamanho e um cromossoma supranumerário de pequeno tamanho.

Estes cromossomas são em grande parte ou totalmente heterocromáticos. No entanto, em alguns casos como no milho, os cromossomas B contêm segmentos eucromáticos de tamanho razoável, enquanto que noutros são inteiramente eucromáticos (White, 1973).

A questão óbvia é a de saber se os cromossomas B terão algum efeito fenotípico que confira uma vantagem selectiva aos indivíduos que os possuam. Embora se pense que não, a resposta a esta questão ainda é muito equívoca, na medida em que é difícil explicar a presença de um cromossoma supranumerário sem vantagem selectiva, em várias espécies de animais e plantas, ou seja, que possua uma existência tão generalizada (Jones e Puertas, 1995). Nas plantas, o efeito dos cromossomas B traduz-se numa redução da fertilidade, proporcional ao seu número (Jones e Puertas, 1995). Nos animais existem menos estudos efectuados.

O aparecimento deste tipo de cromossomas é mais frequente nas plantas e nos insectos, mas foram descritos também em platelmintas, crustáceos, anfíbios, répteis ou mamíferos (Jones e Rees, 1982). Nos moluscos, a presença de cromossomas B foi assinalada no gasterópode *Helix pomatia* (Evans, 1960) e numa população do bivalve veneroide *Cerastoderme edule* (Insua e Thiriot-Quiévreux, 1992).

O facto de serem uma colecção muito heterogénea de elementos supranumerários presentes em diversas espécies, sugere que os cromossomas B possam ser uma das formas de evolução do genoma ao longo do tempo.

O reduzido número de indivíduos examinados neste trabalho, não nos permitiu porém determinar com exactidão a distribuição dos cromossomas supranumerários na população de Argenton.

Conclusão

Neste capítulo, estudamos os cariótipos de nove espécies de ostras com interesse comercial. Os resultados obtidos podem ser reunidos em dois grupos.

1 - Resultados que permitem confirmar observações já existentes na bibliografia ou efectuar comparações com estas, no que diz respeito:

- à composição do cariótipo padrão das espécies, *Crassostrea gigas*, *Crassostrea angulata*, *Crassostrea virginica*, *Crassostrea rhizophorae* e *Ostrea edulis*;

- à localização das regiões dos organizadores nucleolares nas espécies *Crassostrea gigas* e *Ostrea edulis*;

2 - Resultados originais no que diz respeito:

- ao estabelecimento dos cariótipos das espécies *Crassostrea ariakensis*, *Crassostrea gasar*, *Crassostrea sikamea* e *Saccostrea commercialis;*

- à localização das regiões dos organizadores nucleolares nas espécies *Crassostrea angulata*, *Crassostrea virginica*, *Crassostrea rhizophorae*, *Crassostrea ariakensis*, *Crassostrea gasar*, *Crassostrea sikamea* e *Sacostrea Commercialis*;

- à identificação das regiões de heterocromatina, através do método das bandas C, na espécie *Ostrea edulis;*

- à identificação individual de cada par de cromossomas homólogos, pela marcação pelas bandas G, nas espécies *Crassostrea gigas, Crassostrea angulata* e *Crassostrea virginica*;

- à obtenção de um modelo preliminar de bandas R nas espécies *Crassostrea gigas, Crassostrea angulata, Crassostrea virginica e Ostrea edulis*

Synthèse: Chapitre I - Identification des chromosomes.

Les travaux antérieurs concernant la cytogénétique de la famille des Ostreidae ont montré que la plupart des espèces étudiées avaient un nombre chromosomique diploïde de 2n = 20 et un caryotype symétrique (cf. tableau 1, page11). Les différences interspécifiques observées étaient le plus souvent basées sur la présence et le nombre de paires de chromosomes métacentriques ou submétacentriques. Cependant, la comparaison des caryotypes d'une même espèce montrait parfois des différences qui pouvaient être dues soit à un polymorphisme entre les populations étudiées soit à des différences dans les techniques utilisées selon les auteurs. L'application des techniques de marquage des chromosomes s'est avérée très utile pour préciser l'identification des différentes paires de chromosomes. Le but de ce chapitre a été tout d'abord d' établir les caryotypes standards de huit espèces d'Huîtres creuses d'origine géographique différente, par une analyse morphométrique des chromosomes et par l'application de la technique de marquage des régions d'organisateurs nucléolaires (NORs) dont le potentiel taxonomique a été démontré. L'identification des paires de chromosomes a ensuite été effectuée par l'application des bandes C, G et R chez quelques espèces cibles d'Huîtres.

Les espèces étudiées (cf tableau 2, page 22) ont toutes été conditionnées au Laboratoire Génétique et Pathologie (IFREMER, La Tremblade) avant d'effectuer le protocole de cytogénétique à l'Observatoire Océanologique de Villefranche sur Mer. Les chromosomes ont été obtenus à partir d'une technique de suspension cellulaire de tissu branchial. Les préparations ont été colorées par le Giemsa standard et par différentes techniques de marquages. L'analyse morphométrique des caryotypes (programme Excel macro) a été effectuée avec une table à digitaliser couplée à un ordinateur.

Les résultats obtenus nous ont permis de confirmer la composition du caryotype et la localisation des NORs de *Ostrea edulis* et *Crassostrea gigas*, et d'établir les caryotypes de *C. angulata*, *C. virginica* et *C. rhizophorae* en les comparant avec des travaux antérieurs.

Des résultats originaux ont été apportés sur l'obtention des caryotypes de *C. sikamea*, *C. ariakensis*, *C. gasar* et *Saccostrea commercialis*, et sur la localisation des NORs chez *C. angulata, C. sikamea, C. virginica, C. ariakensis, C. gasar, C. rhizophorae et Saccostrea commercialis* (cf Figure 14, page 39) L'analyse caryologique comparative (analyse en composantes principales et classification ascendante hiérarchique) des huit espèces d'Huîtres creuses étudiées (cf Figures 15 et 16, page 40) met en évidence l'isolation de *C. gasar et C. rhizophorae*. Puis, deux groupes se distinguent: le premier est constitué de *C. gigas, C. angulata* et *C. sikamea*, le deuxième de *C. ariakensis*, *C. virginica* et *S. commercialis*. La localisation des NORs permet de différencier des espèces ayant des caryotypes proches: *C. angulata* et *C. sikamea,* et *C. virginica* et *C. ariakensis*.

L'identification des régions de l'hétérochromatine constitutive par la méthode de bandes C a montré trois paires de chromosomes marquées (n° 1, 4 et 10) chez *Ostrea edulis.*

L'identification individuelle de chaque paire de chromosomes par le marquage en bandes G a été effectuée chez *C. gigas, C. angulata* et *C. virginica* L'analyse comparée du marquage en bandes G de ces trois espèces a montré que les principales bandes présentaient un modèle très proche. Cependant, *C. gigas* et *C. angulata* diffèrent par le modèle de bandes G sur le chromosome 7, ce qui corrobore leur differenciation taxonomique. *C. gigas* et *C. virginica* se distinguent par le marquage en bandes G des bras courts des chromosomes 1, 2, 4 et 7 et par celui des bras longs des chromosomes 5, 6, 7, 8 et 9. Ces différences génétiques sont en accord avec nos analyses caryologiques et avec des travaux antérieurs de phylogénie moléculaire.

Le modèle en bandes G , obtenu chez *Ostrea edulis*, est encore préliminaire dû au faible nombre de mitoses marquées positivement. Le marquage en bandes R, dont le dessin est le contretype de celui des bandes G, a été effectué chez *O. edulis, C. gigas, C. angulata* et *C. virginica*. Les modèles obtenus restent à confirmer.

L'application des techniques de marquage des chromosomes en bandes G et R aux différentes espèces d'Huîtres apporte donc une nouvelle approche pour la taxonomie et la génétique des Huîtres.

Capítulo II

Fenómeno da aneuploidia na espécie *Crassostrea gigas*

Introdução

O **fenómeno de aneuploidia** é um fenómeno citológico, que pode ser definido pela existência de mais de dois cromossomas homólogos por par cromossómico (hiperdiploidia), ou pela ausência de um ou dos dois cromossomas num par de homólogos (hipodiploidia).

Este fenómeno tem origem na não disjunção ou no atraso na ascensão anafásica durante a mitose ou a meiose (*e.g.* Bond e Chandley, 1983; Martin *et al.*, 1990; Verma, 1990). Outra das causas da aneuploidia pode ser a "PCA", i. e. divisão centromérica prematura (Verma, 1990).

Factores genéticos podem estar envolvidos na predisposição para o aparecimento da aneuploidia nos humanos (Verma, 1990). Já em 1983 se conheciam genes responsáveis pela não disjunção em plantas e animais (Bond e Chandley, 1983).

No entanto há igualmente sugestões de que factores ambienciais, factores endógenos relacionados com a idade bem como predisposições fisiológicas, poderiam estar na origem do aparecimento de aneuploidias (Verma, 1990).

A aneuploidia pode causar desequilíbrios na dosagem genética e frequentemente tem consequências severas. Estas consequências não dizem respeito a alterações qualitativas, mas sim a alterações quantitativas dos genes. Estas, por seu lado, conduzem a alterações no produto de expressão destes, levando ao aparecimento de anormalidades específicas (Verma, 1990).

Nos **vertebrados superiores**, como os mamíferos, as aneuploidias autossómicas são frequentemente letais ou associadas a atrasos de crescimento (Vig e Sandberg, 1987). A tolerância máxima a casos de aneuploidia por ganho de cromossomas é de 10% na Drosophila e 6% no humano, e de 3% em ambos, no caso de ausência de cromossomas (Hecht e Hecht, 1987).

A presença de aneuploidia em **plantas e animais inferiores**, é conhecida há mais de um século. O desequilibro causado pela aneuploidia parece ser melhor tolerado nas plantas e nos animais inferiores, do que nos humanos (Verma, 1990; Wang *et al.*, 1999).

Nos **invertebrados e particularmente nos bivalves**, vários casos de aneuploidia foram observados (*e.g.* Longwell e Stiles, 1967; Stiles e Longwell, 1973; Ahmed e Sparks, 1967; Dixon, 1982). Para além disso, Dixon pôs em evidência uma relação entre aneuploidia e poluição, descrevendo a presença de 8% de embriões aneuploides na espécies *Mytilus edulis* numa zona não poluída e de 26% de embriões aneuploides numa zona poluída. Martinez-Exposito et *al.*, 1992 observaram níveis de aneuploidia de 23% e 32% em populações naturais de *Mytilus galloprovincialis*. Li e Havenhand, 1997 descreveram a presença de 7% de hipodiploidias na espécie de ostra *Ostrea angasi*.

Relativamente à aneuploidia na espécie de ostra ***Crassostrea gigas***, a consulta bibliográfica que fiz, revelou apenas os grupos de Thiriot-Quiévreux e de Guo, como tendo investigado este assunto. Thiriot-Quiévreux (1986), Thiriot-Quiévreux *et al.*, (1988, 1992), e Zouros *et al.*, (1996), mostraram a existência de uma percentagem substancial de células somáticas que possuem menos cromossomas que o complemento cromossómico normal de 2n=20 (hipodiploidia) e Guo e Allen (1994b), puseram em evidência a presença de aneuploidia em tetraploides viáveis, nesta espécie.

A ostra japonesa *Crassostrea gigas* é a espécie de ostra mais consumida na Europa e, por consequência, a mais cultivada.

A cultura desta espécie é confrontada, essencialmente nas bacias hidrográficas antigas, com problemas de crescimento que podem, em certos casos, estar ligados a uma sobrecarga da capacidade trófica local.

Duas soluções são possíveis para resolver este problema:

- diminuir as biomassas de cultura, solução à qual se opõem frequentemente os produtores.
- seleccionar linhagens de ostras que apresentem:
  - rendimentos metabólicos mais fracos;
  - taxas de filtração mais baixas;
  - rendimentos de assimilação mais elevados, ou seja, que a partir da mesma quantidade de alimento ingerido, sejam capazes de obter taxas de crescimento mais elevadas.

A variabilidade da taxa de crescimento constitui um dos maiores problemas na cultura comercial desta espécie, juntamente com os problemas de overstocking e de limitação das capacidades tróficas dos locais de produção.

Mesmo entre indivíduos com a mesma idade, criados nas mesmas condições, uma grande variação no tamanho da concha pode ser observado (Mallet e Haley, 1983).

Uma correlação positiva entre heterozigotia alozímica e taxa de crescimento foi posta em evidência nesta espécie de ostra, encontrando-se bem descrita na literatura (revisão efectuada por Zouros e Foltz, 1984a).

Thiriot-Quiévreux, 1986, e Thiriot-Quiévreux *et al.*, 1988, 1992, mostraram que nesta espécie existe uma correlação negativa entre o nível de hipodiploidia somática e a taxa de crescimento. Ou seja, que os animais de grande tamanho apresentavam uma percentagem de aneuploidia inferior à apresentada pelos animais de pequeno tamanho.

Apesar destes dois factores, aneuploidia e deficiência heterozigótica, terem ambos um efeito negativo sobre a taxa de crescimento, nenhuma relação entre eles foi demonstrada. Os efeitos sobre a taxa de crescimento por parte destes dois factores, parecem ter bases genéticas diferentes (Thiriot-Quiévreux *et al.*, 1992).

Um melhor conhecimento das possíveis relações entre taxa de crescimento e factores genéticos, poderá contribuir de uma forma importante na cultura desta espécie, e no geral, de todas as espécies de bivalves com importância comercial.

O **objectivo do programa GENEPHYS** ("Genetical bases and variability of physiological traits involved in growth in *Crassostrea gigas*"), financiado pela comunidade Europeia, para o qual contribuiu uma parte da investigação efectuada nesta tese, era o de inferir sobre a possibilidade de melhoramento genético das características fisiológicas relacionadas com o crescimento, na espécie *Crassostrea gigas*.

Os objectivos a atingir neste programa eram:

- a expressão do máximo de variabilidade de crescimento a partir de um lote de genitores de diferentes origens, quer no estado larvar, quer no estado adulto;

- verificar a constância no tempo das performances de crescimento e das funções fisiológicas;

- explicar o diferencial de crescimento observado através de diferentes funções fisiológicas;

- estabelecer se o diferencial de crescimento e as funções fisiológicas estariam associados a uma base genética, utilizando para tal dois tipos de marcadores (aloenzimas e micro-satélites) e ligando-os à taxa de aneuploidia, e eventualmente à identificação dos cromossomas ausentes;

- avaliar a variação genética (aditividade e dominância) e a hereditariedade do crescimento e das características fisiológicas numa segunda geração;

- avaliar a hereditariedade da aneuploidia numa segunda geração;

- avaliar as possibilidades de selecção para um melhor rendimento de assimilação. Pela criação de um esboço de um mapa genético, lançar as primeiras bases de uma selecção assistida por marcadores e pelo colocar em evidência de QTL("Quantitative Trait Loci").

O participante nº 1 e organizador deste projecto, "Le Laboratoire Génétique et Pathologie" (IFREMER,La Tremblade) teve um papel fundamental na medida em que estabeleceu uma população com uma grande base genética, material de base para todas as experiências a serem desenvolvidas, por todos os outros participantes.

A nossa contribuição a este programa, consistiu nos quatro objectivos seguintes:

- estudo da aneuploidia (e sua relação com a taxa de crescimento) nas populações criadas no âmbito do programa GENEPHYS;
- estudo da aneuploidia (e sua relação com a taxa de crescimento) numa população natural de controlo;
- estudo da eventual transmissão da aneuploidia;
- estudo de uma eventual base genética na relação aneuploidia crescimento.

Material e Métodos

Material

1. Populações criadas no âmbito do programa GENEPHYS

Recolha dos genitores G0

Ostras *Crassostrea gigas* adultas, foram recolhidas do meio natural em Janeiro de 1996, pelo "Laboratoire Génétique et Pathologie" (IFREMER, La Tremblade), em quatro locais diferentes (pertencentes a quatro populações): estuário de Seudre (SEU), bacia hidrográfica de Arcachon (ARC), estuário da Charente, Port des Barques (PDB) e baia de Bonne Anse (BA). (Figura 27)

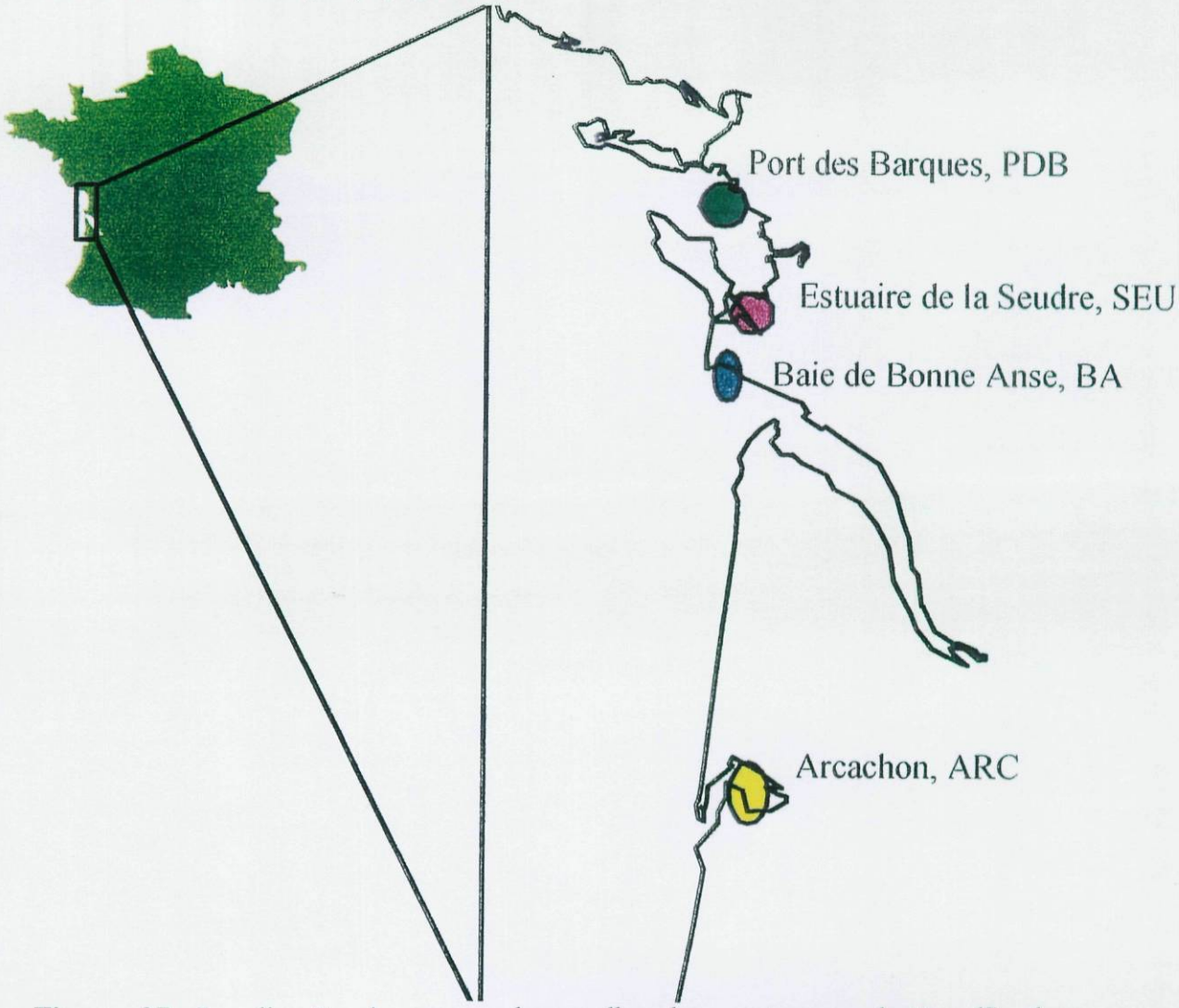


Figura 27: Localização das zonas de recolha das quatro populações (Seudre, Arcachon, Port des Barques e Bonne Anse) , a partir do relatório anual do programa GENEPHYS 1996.

Cruzamentos

Cinco machos e cinco fêmeas por população, foram seleccionados ao acaso, e utilizados como genitores.

Dois tipos de cruzamentos foram efectuados em Abril de 1996 pelo "Laboratoire Génétique et Pathologie" (IFREMER, La Tremblade):

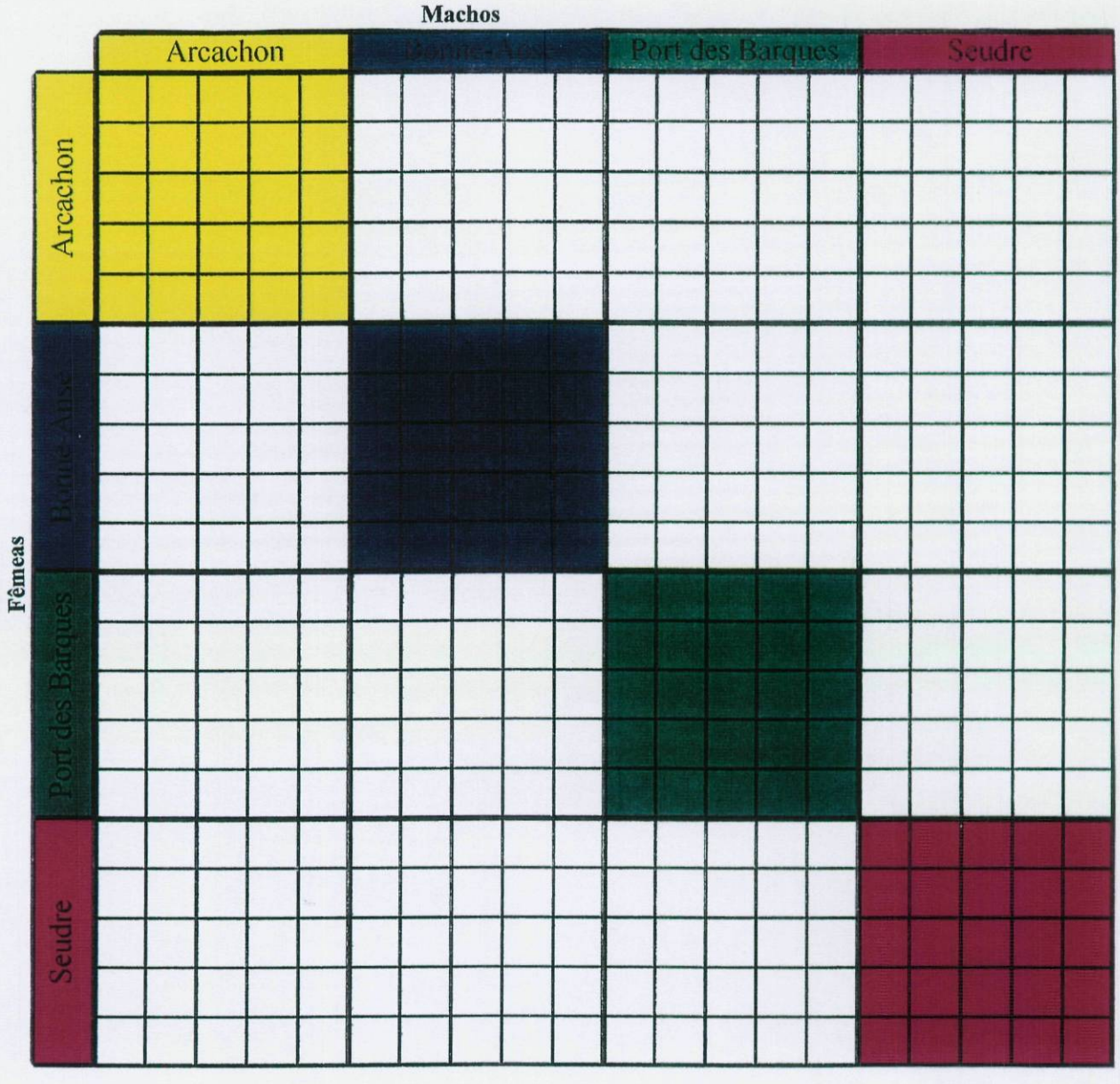


Figura 28: Esquematização dos cruzamentos efectuados. Cada quadrado pequeno corresponde a um cruzamento. Os 400 cruzamentos foram agrupados num lote denominado 20x20. Cada quadrado grande com cor corresponde aos cruzamentos intra população, feitos separadamente. Os 4 agrupamentos de 25 cruzamentos cada, foram chamados 5x5 (a partir do relatório anual do programa GENEPHYS, 1996).

Cruzamento factorial 20x20 (Figura 28)

Este cruzamento foi efectuado com os genitores das quatro origens francesas citadas acima. Cada macho e cada fêmea foram cruzados entre si em todas as combinações possíveis (400 casais, 400 cruzamentos).

Ao longo deste capítulo, os descendentes deste cruzamento serão chamados G1 20x20.

Os descendentes deste cruzamento foram misturados. De acordo com o seu desenvolvimento, puderam distinguir-se nas larvas da população 20x20, 4 "pseudocohortes", isto é , subpopulações de larvas com desempenhos de crescimento diferentes: pseudocortes 1, 2, 3 e 4. 40 animais de cada uma das quatro pseudo-cohortes foram utilizados para estimação da aneuploidia (Figura 29).

Uma extensa mortalidade devido à presença de um vírus tipo-herpes, ocorreu em Maio 1996, tornando impossível a utilização dos animais descendentes deste cruzamento 20x20 nas próximas etapas deste projecto.

Cruzamentos factoriais 5x5 (Figura 28)

Quatro cruzamentos factoriais independentes 5x5 intra população foram efectuados. As cinco fêmeas de cada origem geográfica foram fecundadas pelos cinco machos da mesma origem.

Ao longo deste capítulo, os descendentes destes cruzamentos serão chamados G1 5x5. O nome da população parental (Seudre, Port des Barques, Bonne Anse e Arcachon) será utilizado para designar os descendentes de cada um dos cruzamentos.

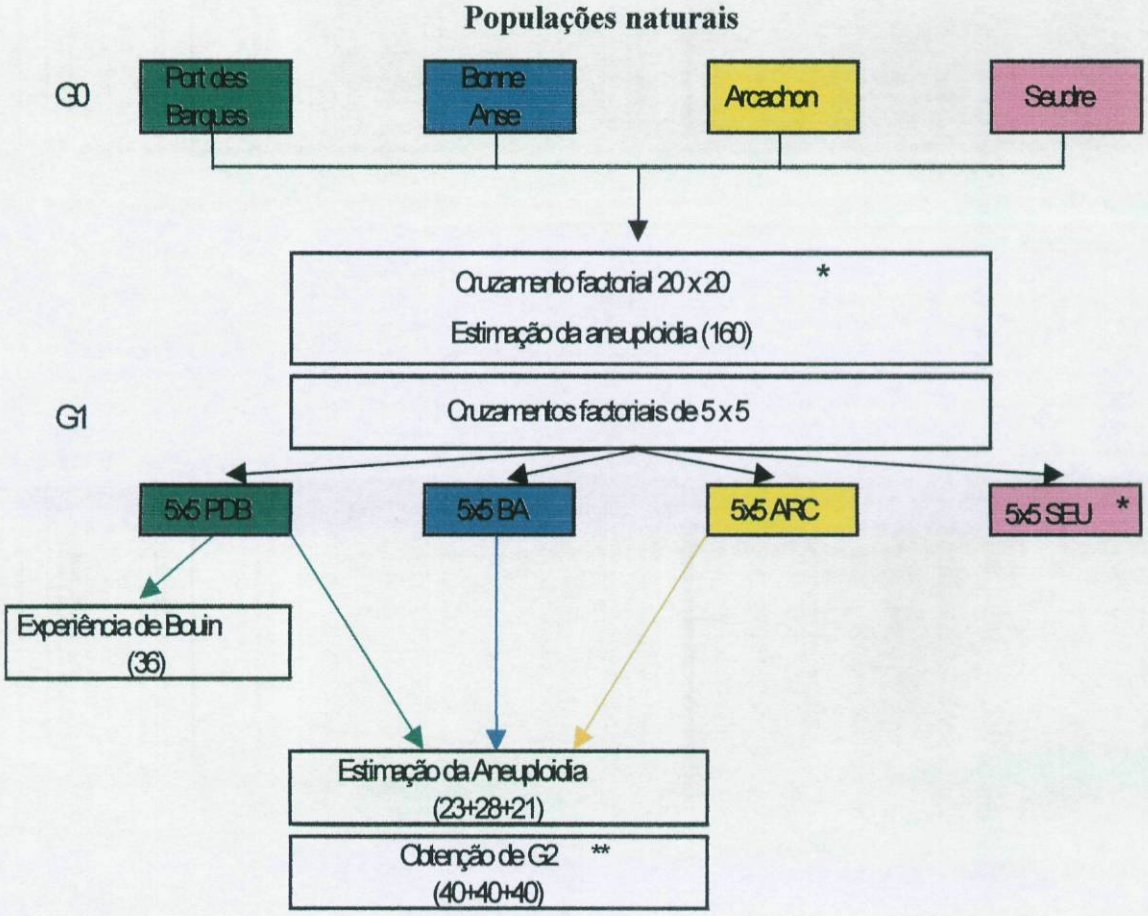
Estes descendentes foram conservados separadamente por grupo geográfico.

Os descendentes do cruzamento 5x5 de Seudre foram vítimas, tal como os descendentes do cruzamento 20x20, do vírus herpes.

Os descendentes dos cruzamentos 5x5 de Port des Barques, Bonne Anse e Arcachon serão utilizados (Figura 29):

- na experiência de obtenção de G2 (40 animais de cada um dos cruzamentos) para estudo da eventual transmissão da aneuploidia;
- na estimação da aneuploidia total e por grupo de tamanho (13 animais pequenos e 10 grandes de Port des Barques, 12 animais pequenos e 16 grandes de Bonne Anse e 11 animais pequenos e 10 grandes de Arcachon).

Os descendentes do cruzamento 5x5 de Port des Barques serão igualmente utilizados para uma experiência, na qual serão efectuados em simultâneo estudos de estimação da aneuploidia, de crescimento, e da actividade enzimática. Estes animais pertencentes a três classes de tamanho diferentes (12 grandes, 12 médios e 12 pequenos) foram acondicionados na estação IFREMER de Bouin (Figura 29).



* Animais mortos após o aparecimento de um vírus herpes, em Maio de 1996
**Animais utilizados para o estudo da aneuploidia através de um método não destructivo-biopsia
( ) Número de animais estudados

Figura 29: Síntese do material biológico utilizado para os estudo da aneuploidia, proveniente dos cruzamentos 20x20 e 5x5.

2. Famílias de "full sibs" (plenos parentes)

24 famílias de "full-sibs" foram produzidas simultaneamente, pelo participante nº1 do programa GENEPHYS, para o estudo das bases genéticas da adaptação às variações ambienciais, ao longo do tempo.

100 animais foram pesados individualmente em Junho de 1998 nas 24 famílias de "full-sibs". O peso médio de cada família corresponde à média intra-família e a média do conjunto de todas as famílias corresponde à média inter-família.

Para estudar a eventual base genética da relação entre a aneuploidia somática e a taxa de crescimento, seleccionámos 6 famílias de forma a obter animais com os pesos intra-família pertencentes aos valores extremos e intermediários:

Família	Peso médio intra-família	Peso médio inter-famílias
10	0.590	0.983
18	0.751	0.983
19	0.906	0.983
3	1.012	0.983
22	1.222	0.983
24	1.488	0.983

No interior destas famílias, 10 animais com o peso médio intra-família e 10 animais com o peso médio inter-família, foram preparados para o estudo da aneuploidia.

3. População controlo

Ostras originárias da Escócia, foram utilizadas como genitores para a produção de uma população controlo.

A reprodução foi efectuada na "hatchery" de Argenton (estação IFREMER na Bretanha, França), e os juvenis foram criados na estação de Bouin (estação IFREMER, na costa Atlântica Francesa).

O envio dos animais para o laboratório de Villefranche sur Mer, foi efectuado em duas etapas:

1° Etapa – em Abril 1997, envio de 11 animais, seleccionados ao acaso;

2° Etapa – em Setembro de 1997, envio de 30 animais, seleccionados por classes de tamanho (15 grandes e 15 pequenos).

Métodos

Todos os animais enviados para Villefranche sur Mer para estudo da aneuploidia, foram previamente acondicionados na estação de La Tremblade. Este acondicionamento tinha como objectivo o de incentivar a divisão celular nos animais, e de aumentar o índice mitótico.

1. Obtenção das preparações cromossómicas

Os esfregaços cromossómicos foram obtidos mediante a técnica de suspenção celular descrita por Thiriot-Quiévreux e Ayraud (1982), apresentada em detalhe no capítulo I e que consiste nas seguintes etapas:

- bloqueio das mitoses em metafase;
- choque hipotónico;
- fixação;
- execução das lâminas;
- coloração standart com o corante Giemsa.

2. Estimação da aneuploidia

A contagem cromossómica foi efectuada directamente a partir da observação microscópica (fotomicroscópio Zeiss III), em metafases aparentemente intactas e bem espalhadas e, sempre que possível, que apresentassem um espalhamento idêntico.

Neste estudo, a contagem das células nos vários animais e nas várias experiências, foi sempre efectuada pelo mesmo observador, de forma a eliminar a subjectividade inerente a diferentes observadores, na futura interpretação dos resultados.

A estimação da aneuploidia foi efectuada pela contagem de 30 células por animal, escolhidas ao acaso. Este é normalmente o número estipulado como mínimo estatisticamente aceitável (Stallard *et al.*, 1981; Wenger *et al.*, 1984). Foram consideradas como aneuploides as células que apresentavam 2n=19, 18 ou 17.

Através da aplicação dos critérios de selecção acima mencionados, a probabilidade de que as células aneuploides sejam resultado de artefactos do método de suspensão celular utilizado na obtenção das preparações cromossómicas é reduzida. Aliás, Thiriot-Quiévreux, 1986, mostrou através de um estudo efectuado em células com os cromossomas muito e pouco espalhados, que as proporções obtidas de células com 2n=20 e células aneuploides eram semelhantes nos dois casos. O grande número de células por nós examinadas permite-nos considerar os resultados como fiáveis, mesmo tendo em conta alguma perda cromossómica devida à técnica.

3. Tratamento estatístico

Os tratamentos estatísticos foram efectuados pela utilização de um teste de análise de variância a um factor (ANOVA) e da função BOXPLOT de um programa de estatística MATLAB (MATLAB "The language of technical computing", ver. 5.3.0 (1999). The MathWorks, Inc.). Esta função apresenta diferentes caixas ("boxplot") dos dados e traça linhas ("whisker plot") para cada coluna do eixo dos X. A caixa apresenta linhas para os valores mais baixos, médios e altos. Os "whiskers" são linhas que se estendem de ambas as extremidades da caixa para mostrar os restantes dados. São considerados "outsiders", dados cujos valores estejam além do espaço limitado pelos "whiskers".

Resultados

1. Estudo da aneuploidia nas populações criadas no âmbito do programa GENEPHYS

População proveniente do cruzamento 20x20

Os quadros abaixo apresentados, contêm os resultados do estudo da aneuploidia efectuado nas 4 "pseudocohortes", provenientes do cruzamento 20x20.

Estes resultados foram obtidos a partir do estudo de 160 animais (40 por pseudo-cohorte), como referido nos materiais e métodos, o que implicou a contagem de 4800 mitoses.

Quadro 10: Estimação da aneuploidia na pseudocohorte 1

animal #	nº de mitoses estudadas	nº total de mitoses 2n= 19, 18, 17
1	30	12
2	30	9
3	30	9
4	30	11
5	30	7
6	30	7
7	30	8
8	30	10
9	30	8
10	30	10
11	30	6
12	30	10
13	30	8
14	30	7
15	30	7
16	30	10
17	30	10
18	30	9
19	30	7
20	30	7
21	30	8
22	30	6
23	30	6
24	30	8
25	30	7
26	30	7
27	30	7
28	30	7
29	30	9
30	30	7
31	30	10
32	30	7
33	30	6
34	30	6
35	30	9
36	30	10
37	30	4
38	30	10
39	30	7
40	30	8

%Total = 27%

Quadro 11: Estimação da aneuploidia na pseudocohorte 2

animal #	nº de mitoses estudadas	nº total de mitoses 2n=19, 18, 17
1	30	9
2	30	11
3	30	12
4	30	10
5	30	6
6	30	8
7	30	8
8	30	4
9	30	13
10	30	10
11	30	6
12	30	8
13	30	12
14	30	11
15	30	11
16	30	8
17	30	9
18	30	9
19	30	14
20	30	9
21	30	11
22	30	11
23	30	13
24	30	10
25	30	9
26	30	9
27	30	11
28	30	9
29	30	10
30	30	9
31	30	9
32	30	9
33	30	13
34	30	12
35	30	13
36	30	11
37	30	10
38	30	11
39	30	9
40	30	11

%Total = 34%

Quadro 12: Estimação da aneuploidia na pseudocohorte 3

animal #	nº de mitoses estudadas	nº total de mitoses 2n=19, 18, 17
1	30	8
2	30	10
3	30	8
4	30	13
5	30	8
6	30	12
7	30	8
8	30	9
9	30	13
10	30	12
11	30	13
12	30	12
13	30	8
14	30	9
15	30	10
16	30	12
17	30	8
18	30	11
19	30	9
20	30	9
21	30	13
22	30	15
23	30	12
24	30	9
25	30	10
26	30	8
27	30	10
28	30	10
29	30	12
30	30	10
31	30	8
32	30	13
33	30	9
34	30	10
35	30	11
36	30	8
37	30	9
38	30	11
39	30	7
40	30	8

%Total =33%

Quadro 13: Estimação da aneuploidia na pseudocohorte 4

animal #	nº de mitoses estudadas	nº total de mitoses 2n=19, 18, 17
1	30	8
2	30	10
3	30	8
4	30	13
5	30	8
6	30	12
7	30	8
8	30	9
9	30	13
10	30	12
11	30	13
12	30	12
13	30	8
14	30	9
15	30	10
16	30	12
17	30	8
18	30	11
19	30	9
20	30	9
21	30	13
22	30	15
23	30	12
24	30	9
25	30	10
26	30	8
27	30	10
28	30	10
29	30	12
30	30	10
31	30	8
32	30	13
33	30	9
34	30	10
35	30	11
36	30	8
37	30	9
38	30	11
39	30	7
40	30	8

%Total =28%

A utilização de um teste ANOVA (a um factor) mostrou que as frequências das aneuploidias das 4 pseudocohortes eram significativamente diferentes a p=0,05.

As percentagens totais de aneuploidia obtidas de 27%, 34%, 33% e 28% nas pseudocohortes 1, 2, 3 e 4 respectivamente são relativamente elevadas em comparação com resultados prévios obtidos no estudo de aneuploidia em populações de *Crassostrea gigas* (Thiriot-Quiévreux *et al.*, 1988,1992; e Zouros *et al.*, 1996).

Populações provenientes dos cruzamentos 5x5

Animais de duas classes de tamanho diferentes de cada um dos 3 cruzamentos 5x5, Port des Barques, Bonne Anse e Arcachon foram estudados para estimação da aneuploidia.

O cruzamento 5x5 de Seudre, como referido nos materiais e métodos, foi destruído pela presença do vírus herpes, tal como os descendentes do cruzamento 20X20.

Os resultados abaixo apresentados, são dados para 13 animais pequenos e 10 grandes de Port des Barques, 12 animais pequenos e 16 grandes de Bonne Anse, e 11 animais pequenos e 10 grandes de Arcachon. 30 mitoses foram contadas em quase todos os animais, mas em alguns animais do cruzamento 5x5 de Arcachon, devido ao reduzido número de mitoses disponíveis, a contagem deste número mínimo de mitoses por animal não foi possível. No total, 72 animais e 2037 mitoses foram contadas.

Quadro 14: Estimação da aneuploidia na população 5x5 de Port des Barques

animal #	Tamanho dos animais	N° total de mitoses estudadas	N° total de mitoses aneuploides
3	pequeno	30	7
4	pequeno	30	7
5	pequeno	30	8
6	pequeno	30	5
7	pequeno	30	8
8	pequeno	30	9
9	pequeno	30	8
10	pequeno	30	8
11	pequeno	30	8
12	pequeno	30	8
13	pequeno	30	10
1	pequeno/M	30	10
2	pequeno/M	30	8
14	grande	30	8
15	grande	30	3
16	grande	30	5
17	grande	30	4
18	grande	30	5
19	grande	30	5
20	grande	30	6
21	grande	30	5
22	grande	30	5
23	grande	30	7

%Total = 23%

Quadro 15: Estimação da aneuploidia na população 5x5 de Bonne Anse

animal #	Tamanho dos animais	N° total de mitoses estudadas	N° total de mitoses aneuploides
1	pequeno	30	8
2	pequeno	30	5
3	pequeno	30	9
4	pequeno	30	8
5	pequeno	30	11
6	pequeno	30	6
7	pequeno	30	6
8	pequeno	30	10
9	pequeno	30	5
10	pequeno	30	6
11	pequeno/M	30	9
12	Médio	30	7
13	M/grande	30	7
14	grande	30	6
15	grande	30	8
16	grande	30	8
17	grande	30	8
18	grande	30	5
19	grande	30	3
20	grande	30	6
21	grande	30	6
22	grande	30	5
23	grande	30	5
24	grande	30	6
25	grande	30	7
26	grande	30	3
27	grande	27	3
28	grande	30	8

%Total = 22%

Quadro 16: Estimação da aneuploidia na população 5x5 de Arcachon

animal #	Tamanho dos animais	N° total de mitoses estudadas	N° total de mitoses aneuploides
1	pequeno	30	7
2	pequeno	30	6
3	pequeno	30	7
4	pequeno	14	6
5	pequeno	10	1
6	pequeno	14	4
7	pequeno	30	13
8	pequeno	30	10
9	pequeno	28	8
10	pequeno	30	8
11	pequeno/M	20	3
12	grande	30	6
13	grande	18	5
14	grande	23	4
15	grande	30	6
16	grande	30	7
17	grande	20	8
18	grande	30	6
19	grande	17	3
20	grande	30	5
21	grande	26	6

%Total = 25%

A comparação entre a percentagem de aneuploidia nos descendentes dos três cruzamentos 5x5, foi efectuada tendo por base o mesmo número de animais, escolhidos ao acaso, em ambas as classes de tamanho, i.e. 10 animais pequenos de Port des Barques (25%), de Bonne Anse (25%) e de Arcachon (30%) e em 10 animais grandes de Port des Barques (18%), de Bonne Anse (19%) e de Arcachon (22%).

Estas percentagens confirmam a correlação negativa entre hipodiploidia somática e taxa de crescimento posta em evidência por Thiriot-Quiévreux, 1986, Thiriot-Quiévreux *et al.*, 1988, 1992 e Zouros *et al.*, 1996.

A percentagem total de aneuploidia nos descendentes dos três cruzamentos 5x5 (Port des Barques 23%, Bonne Anse 22% e Arcachon 25%) é ligeiramente inferior à observada anteriormente nos descendentes do cruzamento 20x20 (27%, 34%, 33% e 28%), mas mantêm-se ainda relativamente elevada quando comparada com os resultados já existentes, obtidos em outras populações de *Crassostrea gigas* (Thiriot-Quiévreux, 1986, Thiriot-Quiévreux *et al.*, 1988, 1992 e Zouros *et al.*, 1996).

Utilizando um teste ANOVA (a um factor) verificou-se :

- que as frequências de aneuploidia dos descendentes dos 3 cruzamentos 5x5 não são significativamente diferentes a p=0.05;

- que as frequências de aneuploidia dos animais de crescimento lento e dos animais de crescimento rápido do cruzamento 5x5 de Port des Barques são significativamente diferentes a p= 0.00061497;

- que as frequências de aneuploidia dos animais de crescimento lento e dos animais de crescimento rápido do cruzamento 5x5 de Bonne Anse são significativamente diferentes a p= 0.0065;

- a diferença entre as frequências de aneuploidia dos animais de crescimento lento e dos animais de crescimento rápido do cruzamento 5x5 de Arcachon não foi estatísticamente óbvia.

População proveniente do cruzamento 5x5 de port de Barques, acondicionada na estação marinha de Bouin

Foi efectuado o estudo da aneuploidia num grupo de animais da população 5x5 de Port des Barques acondicionada na estação IFREMER de Bouin, para os quais foi efectuado, em simultâneo, o estudo individual da taxa de crescimento e da actividade enzimática, por outros participantes do programa GENEPHYS.

36 animais, de 3 classes de tamanho diferentes: 12 pequenos, 12 médios e 12 grandes, marcados individualmente, foram estudados para a estimação aneuploidia.

Quadro 17: Estimação da aneuploidia na população acondicionada na estação marinha de Bouin

anim #	N° total mitose estudad	n° de mitose 2n=2	N° total mitose aneuploid
PEQUENO			
2120	30	24	6
2119	30	24	6
2013	30	22	8
2009	30	21	9
2315	30	23	7
2213	30	25	5
2212	30	21	9
2218	30	26	4
2211	30	25	5
2012	30	24	6
2217	30	22	8
2113	30	24	6
			% T = 22
MÉDIO			
2419	30	25	5
2511	30	20	10
2618	30	23	7
2514	30	26	4
2519	30	24	6
2014	30	26	4
2518	30	22	8
2719	30	24	6
2311	30	28	2
2612	30	26	4
2611	30	26	4
2818	30	30	0
			% T = 17
GRANDE			
2812	30	28	2
2711	30	28	2
2614	30	28	2
2516	30	28	2
2910	30	28	2
2716	30	29	1
2811	30	28	2
2814	30	28	2
2908	30	28	2
2714	30	27	3
2813	30	30	0
2909	30	27	3
			% T = 6

A aneuploidia observada foi de 22% nos animais pequenos, 17% nos animais de tamanho médio e 6% nos animais de grande tamanho.

Utilizando um teste ANOVA (a um factor) verificou-se que as frequências de aneuploidia dos animais pequenos e grandes são significativamente diferentes a p=0.000000007268.

Utilizando um teste ANOVA (a um factor) verificou-se que as frequências de aneuploidia dos animais pequenos, médios e grandes são significativamente diferentes a p=0.00003875.

A correlação negativa, aqui obtida na população de Bouin, entre o nível de hipodiploidia somática e a taxa de crescimento, que foi medida individualmente pelo participante nº1 do programa GENEPHYS, foi particularmente significativa (a partir do poster "Collet B. Genetical bases and variability of physiological traits involved in growth in *Crassostrea gigas*." Third European Marine Science and Technology conference. Lisboa, Portugal 23-27 Maio 1998).

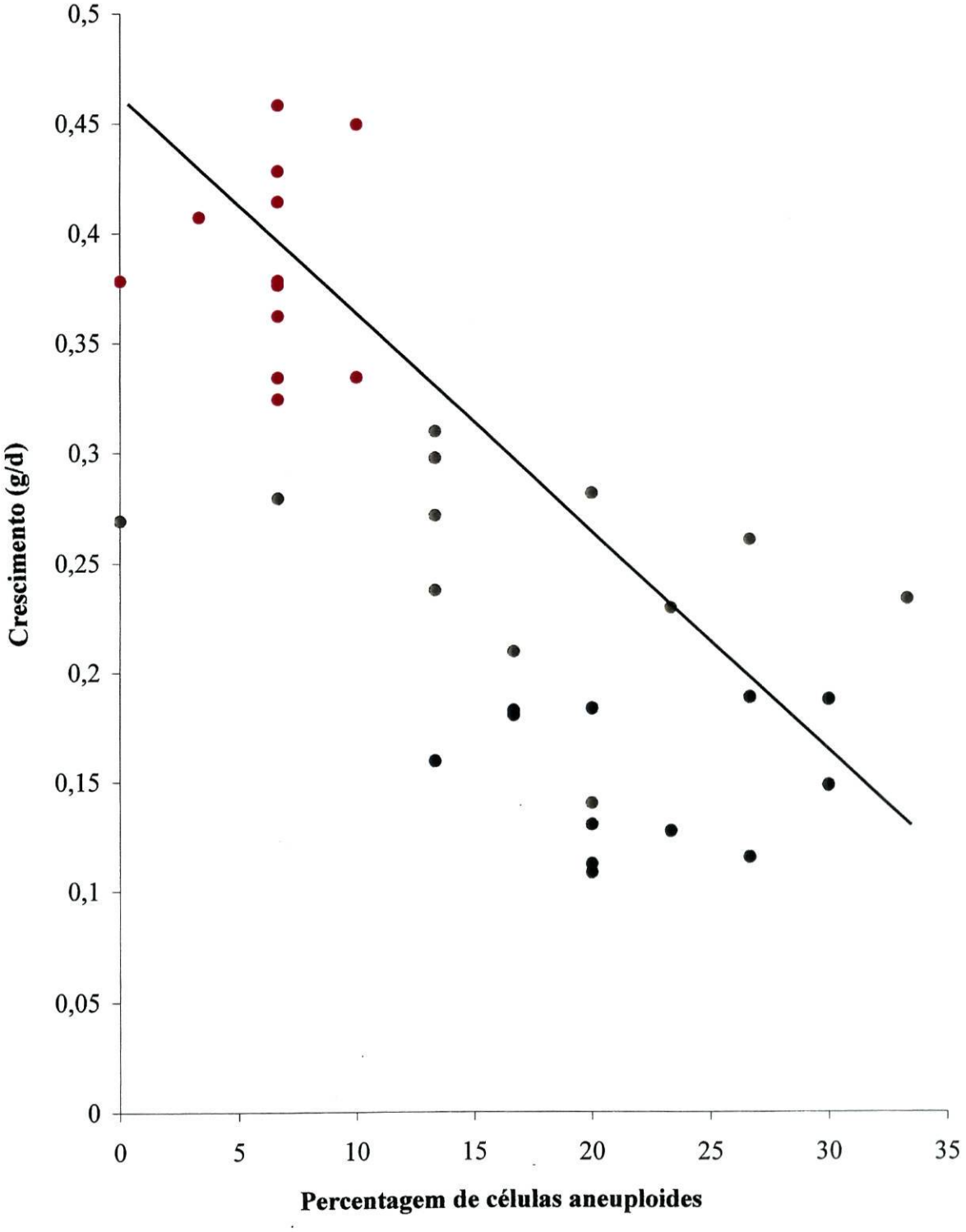


Figura 30: Correlação entre o nível de aneuploidia somática e a taxa de crescimento na população acondicionada na estação marinha de Bouin.

2. Estudo da aneuploidia numa população natural de contrôlo. População de Argenton (genitores escoceses).

Devido às elevadas percentagens de aneuploidia (quando comparadas com os resultados prévios existentes na bibliografia) observadas nas populações criadas no âmbito do programa GENEPHYS, considerou-se ser de interesse proceder ao estudo de uma população exterior ao programa GENEPHYS, a funcionar como população de controle.

Ostras originárias da Escócia, foram utilizadas como genitores para reprodução. Esta foi efectuada na "hatchery" de Argenton (estação IFREMER na Bretanha, França), e os juvenis foram criados na estação de Bouin (estação IFREMER, na costa Atlântica Francesa).

Este estudo foi efectuado em duas etapas:

1º Etapa – Abril 1997

Inicialmente foi efectuado um estudo preliminar em 11 animais, seleccionados ao acaso.

Quadro 18: Estimação da aneuploidia em animais de Argenton, não seleccionados por classe de tamanho.

animal #	Nº total de mitoses estudadas	Nº total de mitoses aneuploides
1	30	0
2	30	0
3	30	0
4	25	2
5	30	0
6	30	1
7	17	2
8	30	0
9	30	0
10	29	4
11	22	1
		%T=3%

6 dos 11 animais apresentavam ausência de células aneuploides.

A percentagem total de aneuploidia (por perda cromossómica, 2n=19, 18 ou 17) observada foi de 3%, ou seja, fraca em comparação com as populações experimentais do programa GENEPHYS.

2° Etapa – Setembro 1997

Devido à fraca percentagem de aneuploidia observada em Abril, na população de Argenton, uma nova experiência foi efectuada, para confirmar os resultados obtidos, e averiguar a existência ou não de uma relação entre nível de aneuploidia (hipodiploidia) somática e a taxa de crescimento nesta população.

30 animais de 2 classes de tamanho diferentes (15 grandes e 15 pequenos) foram estudados para determinação do nível de aneuploidia.

Quadro 19: Estudo da aneuploidia en animais da população de Argenton, seleccionados por classe de tamanho.

animal #	N° total de mitoses estudadas	N° total de mitoses aneuploides
PEQUENOS		
1	30	8
2	30	3
3	30	9
4	30	3
5	30	3
6	30	2
7	30	3
8	30	4
9	30	6
10	30	4
11	30	3
12	30	5
13	30	9
14	30	2
15	30	9
		%Total=16%
GRANDES		
1	30	1
2	30	0
3	30	0
4	30	2
5	30	0
6	30	2
7	30	1
8	30	3
9	30	3
10	30	2
11	30	1
12	30	4
13	30	2
14	30	1
15	30	2
		%Total=5%

A aneuploidia total observada nesta população foi de 11%, sendo de 16% nos animais de pequeno tamanho e de 5% nos animais de grande tamanho.

Utilizando um teste ANOVA verificou-se que as frequências de aneuploidia dos animais pequenos e grandes são significativamente diferentes a $p=0.0004$;

Os resultados obtidos nesta experiência permitiram confirmar: (I) o fraco nível de aneuploidia nesta população, quando comparada com as populações experimentais de GENEPHYS; (II) a existência de uma correlação negativa entre aneuploidia somática (hipodiploidia) e crescimento.

3. Estudo da eventual transmissão da aneuploidia

A observação da correlação negativa entre taxa de crescimento e hipodiploidia somática em todas as populações estudadas anteriormente, suscitou o interesse de averiguar se este fenómeno de aneuploidia seria hereditário, e inferir sobre a possível transmissão de aneuploidia à geração seguinte.

Os genitores utilizados nesta experiência de averiguação da possível transmissão da aneuploidia (G1), são provenientes das populações 5x5 de Port des Barques, Bonne Anse e Arcachon, nas quais cada animal foi marcado individualmente.

Uma vez que o nosso principal objectivo era o de averiguar sobre a eventual transmissão de aneuploidia, do seu caracter hereditário, foi efectuada a tentativa de criar um protocolo de obtenção de um método não destrutivo de estudo da aneuploidia nos genitores.

Para tal, efectuámos várias tentativas de estudo da aneuploidia em biopsias de brânquias. Este método tinha como objectivo permitir o estudo da aneuploidia em cada genitor e que este permanecesse vivo até à época da reprodução.

Tentativa de estabelecimento de um método não destrutivo de estudo da aneuploidia (Biopsia).

Todas as tentativas, aqui efectuadas, de obtenção de um protocolo de biopsias branquiais na espécie *Crassostrea gigas*, tiveram como base a utilização do ião Mg^{2+}. Este ião bloqueia os canais de cálcio na membrana dos terminais pré-sinápticos das sinapses neuro-neuronais no gânglio e das sinapses neuro-musculares, e impede o fluxo de Ca^{2+} para a célula. Sem o aumento da concentração de Ca^{2+} intracelular a substância transmissora de excitação, acetilcolina, não é libertada e o potencial de acção não é transmitido. Consequentemente, a acoplagem excitação-contracção do músculo adutor não é efectuada. (Namba *et al.*, 1995).

Uma vez que o músculo adutor não é capaz de efectuar a contracção, as valvas permanecem abertas, mesmo quando a ostra é sujeita a estímulos tactéis. Esta ausência de reacção aos estímulos tactéis é a base deste protocolo, uma vez que nos será então

possível de proceder a uma biópsia branquial do animal, para efectuar seguidamente as preparações cromossómica e estudo da aneuploidia.

Foram efectuadas três experiências preliminares de obtenção deste método, sobre animais não marcados individualmente. Estas experiências foram efectuadas no "Laboratoire Génétique et Pathologie", IFREMER de La Tremblade, em Outubro de 1996.

Experiência nº1

Protocolo utilizado:

- incubação dos animais em colquicina, durante 12 horas (noite);
- incubação em $MgCl_2$ durante 8 horas (dia);
- execução das biópsia;
- fixações.

Resultados:

O material biopsado apresentava um número considerável de mitoses, mas os cinco animais utilizados nesta experiência, morreram nas 24 horas seguintes.

Possível razão do insucesso desta experiência: O facto do animal ter estado incubado numa solução de colquicina. Esta é um alcalóide que destrui o fuso acromático durante a divisão celular, impedindo-a de ultrapassar o estado de metafase. Logo esta incubação pode ter dado origem a efeitos irreversíveis no organismo dos animais.

Experiência nº2

Protocolo utilizado:

- incubação em Mg Cl_2 durante a noite (18h-8h);
- execução das biópsias;
-incubação do material biopsado durante 2h, 4h e 6h em colquicina respectivamente;
- fixações.

Resultados:

O material biopsado apresentava um fraco número de mitoses.

Não houve quaisquer resultados na série que permaneceu incubada 4h na colquicina.

Dos 15 animais utilizados nesta experiência, apenas 6 morreram nas 48 horas que seguiram (índice de sobrevivência de 60%).

Possível razão do insucesso desta experiência: Provavelmente esta experiência teve fracos resultados no que diz respeito ao número de mitoses presentes nas biópsias branquiais, devido ao facto da absorção da colquicina pelas células ter sido feita de uma forma passiva e não através da actividade de filtração (activa) do animal. Talvez esta actividade seja indispensável a uma óptima absorção de colquicina pelas células branquiais.

Experiência nº3

Esta experiência, tinha como objectivo suplementar, o de averiguar a possível existência de uma relação entre o tamanho dos animais e a reacção ao método não destrutivo de estudo da aneuploidia, no que diz respeito quer à mortalidade consequente quer ao número de mitoses obtidas.

Para tal, 20 animais de duas classes de tamanho diferentes (10 pequenos e 10 grandes) foram utilizados.

Protocolo utilizado:

- incubação em $MgCl_2$ durante 13 horas (dia);
- execução das biópsias branquiais;
- incubação numa solução de colquicina durante 6 horas (noite);
- fixações.

Resultados:

As biópsias apresentavam poucas mitoses, sendo no entanto o seu número superior nos animais de pequeno tamanho.

Dos 20 animais estudados, apenas 4 (1 grande e 3 pequenos) morreram nas 24 horas que seguiram a experiência. O índice de sobrevivência foi de 80%, sendo de 90% nos animais de grande tamanho e de 70% nos animais de pequeno tamanho.

Estudo da aneuploidia em biópsias de animais das populações 5x5 (G1) , marcados individualmente– La Tremblade, Dezembro 1996

Os animais das 3 populações 5x5, identificados individualmente, foram biopsados com base nos resultados obtidos nas 3 experiências preliminares, descritas anteriormente.

A marcação individual foi efectuada por colagem de uma etiqueta com cola Epoxy, em 40 animais de duas classe de tamanhos (20 grandes e 20 pequenos) nas três populações 5x5: Port des Barques, Bonne Anse e Arcachon.

Protocolo utilizado: idêntico ao da experiência nº3

Resultados:

A mortalidade após 48 horas foi de apenas 2%.

O estudo da aneuploidia foi efectuado, numa primeira fase, em 15 animais por grupo 5x5. Devido à escassez e mesmo em alguns casos ausência de mitoses nas preparações cromossómicas efectuadas nestes animais, decidimos não continuar com os restantes.

Possível razão do insucesso desta experiência: A escassez de mitoses nesta experiência, foi provavelmente devida ao baixo índice mitótico característico do período de não crescimento dos animais, (Inverno), razão pela qual planeamos recomeçar esta experiência em condições mais favoráveis (Primavera).

Estudo da aneuploidia em biópsias de animais das populações 5x5 (G1), marcados individualmente – La Tremblade, Março 1997

Uma nova tentativa foi efectuada nos animais previamente marcados individualmente em Dezembro de 1996.

Protocolo utilizado: idêntico ao da experiência nº3

Resultados:

O tratamento com o $MgCl_2$ não foi muito bem sucedido nesta experiência, uma vez que 14 dos animais permaneceram fechados.

As preparações cromossómicas foram efectuadas em 16 animais de Port des Barques, 19 de Bonne Anse e 15 de Arcachon.

O número de mitoses observado foi muito baixo, insuficiente para que o estudo de aneuploidia fosse estatisticamente válido.

A mortalidade foi estranhamente elevada nesta experiência quando comparada com a anterior: mais de 50% dos animais morreram nas duas semanas seguintes.

Possível razão do insucesso desta experiência: O baixo índice mitótico observado foi inesperado para a época do ano. Este baixo índice poderá ser explicado por uma aclimatação insuficiente dos animais, fraca condição biológica destes, ou o tamanho das biopsias.

Em conclusão, o estudo da aneuploidia através de biopsias branquiais não foi possível, devido essencialmente ao baixo índice mitótico observado.

Este método não destrutivo, não pôde, portanto, ser utilizado na selecção de genitores G1, a efectuar por nível conhecido de aneuploidia .

Apesar deste método não poder ser aplicado no estudo da eventual transmissão da aneuploidia, o protocolo aqui estabelecido poderá, no entanto, ser útil em experiências de:

- genética molecular, uma vez que a quantidade de brânquia a biopsar é consideravelmente menor (necessidade de menor quantidade de material para as técnicas desta disciplina) o que aumentará substancialmente o índice de sobrevivência do animal a biopsar;
- citogenética, em estudos que exijam um menor número de mitoses a avaliar.

Estudo da aneuploidia dos genitores através de um método destrutivo

Devido ao insucesso na aplicação de um método não destrutivo (i.e. biopsia) ao estudo da aneuploidia nos potenciais genitores (G1), este estudo foi então efectuado através de um método destrutivo, realizado imediatamente após a desova.

Os seguintes genitores foram escolhidos entre o "stock" de GENEPHYS e o "stock" Escocês (população controlo de Argenton).

Foram realizados 3 cruzamentos 2x2 entre estes dois grupos de animais que tinham já mostrado ter níveis significativamente diferentes de aneuploidia.

E1: Macho Escocês
E2: Macho Escocês
E3: Macho Escocês
G1: Macho GENEPHYS
G2: Macho GENEPHYS
G3: Macho GENEPHYS

E4: Fêmea Escocesa
E5: Fêmea Escocesa
E6: Fêmea Escocesa
G4: Fêmea de GENEPHYS
G5: Fêmea de GENEPHYS
G6: Fêmea de GENEPHYS

Os seguinte cruzamentos (puros e mistos) foram efectuados para obtenção de G2:

Grupo 1	**Grupo2**	**Grupo 3**
Fêmea **G4** x Macho **E1**	Fêmea **E5** x Macho **G2**	Fêmea **G6** x Macho **G3**
Fêmea **E4** x Macho **E1**	Fêmea **G5** x Macho **G2**	Fêmea **E6** x Macho **G3**
Fêmea **G4** x Macho **G1**	Fêmea **E5** x Macho **E2**	Fêmea **G6** x Macho **E3**
Fêmea **E4** x Macho **G1**	Fêmea **G5** x Macho **E2**	Fêmea **E6** x Macho **E3**

Após os cruzamentos, efectuados em la Tremblade, os animais foram processados para o estudo da aneuploidia (incubação em colquicina, dissecção das brânquias, choque hipotónico e fixação), na estação de Villefranche sur Mer.

Devido ao insucesso dos cruzamentos do grupo nº1 (por razões de criação e de mortalidade), as preparações cromossómicas e subsequente estimação da aneuploidia, foram efectuadas apenas nos oito animais restantes, pertencentes aos grupos de cruzamento 2 e 3.

Quadro 20: Estudo da aneuploidia dos animais descendentes dos grupos de cruzamento 2 e 3.

Genitores estudados	Nº de lâminas observadas	Nº total de mitoses	Nº de mitoses 2n=20	Nº mitoses aneuploides 2n=19	2n=18	2n=17	total	% total aneuploidia
E5: fêmea escocesa	10	6	4	1	0	1	2	
E6: fêmea escocesa	**7**	**30**	**27**	**0**	**2**	**1**	**3**	**10%**
G5: fêmea GENEPHYS	**10**	**30**	**23**	**2**	**3**	**2**	**7**	**23%**
G6: fêmea GENEPHYS	10	7	5	2	0	0	2	
E2: macho escocês	**10**	**30**	**28**	**1**	**1**	**0**	**2**	**7%**
E3: macho escocês	**22**	**30**	**24**	**3**	**3**	**0**	**6**	**20%**
G2:macho GENEPHYS	**28**	**30**	**25**	**4**	**1**	**0**	**5**	**20%**
G3:macho GENEPHYS	**18**	**30**	**28**	**2**	**0**	**0**	**2**	**7%**

Observações:

- a obtenção de mitoses em animais adultos é extremamente difícil, razão pela qual em apenas 6 dos animais estudados, foi possível obter o número mínimo de 30 mitoses. Em animais em crescimento este número mínimo é facilmente obtido com a observação de uma ou duas preparações cromossómicas. Neste estudo, no entanto, chegou a ser preciso observar 28 preparações cromossómicas para obter esse mesmo número no animal G2;

- a estimação da aneuploidia individual nem sempre é representativa da aneuploidia da população.

Estudo da aneuploidia nos juvenis (G2) obtidos a partir dos cruzamentos efectuados em 2.

Dos cruzamentos efectuados com sucesso nos grupos 2 e 3, apenas os seguintes puderam ser utilizados para a averiguação da possível transmissão da aneuploidia. Como foi dito anteriormente, só nos foi possível observar um número estatisticamente aceitável de mitoses em seis dos oito animais estudados:

Cruzamento puro, população Escocesa	E3 x E6
Cruzamento puro, população GENEPHYS	G2 x G5
Cruzamento misto Escócia x GENEPHYS	E2 x G5
Cruzamento misto GENEPHYS x Escócia	G3 x E6

Em cada uma das quatro famílias de juvenis, descendentes dos cruzamentos anteriores, 100 animais foram pesados individualmente

O peso médio de cada família corresponde á média intra-família, e a média do conjunto de todas as famílias corresponde á média inter-família.

Nós seleccionámos dentro de cada família dois grupos de animais, para os quais foi efectuado o estudo da aneuploidia:

- 10 animais cujo peso era aproximadamente igual á média intra- família;

- 10 animais cujo peso era aproximadamente igual á média inter-famílias.

Quadro 21: Resultados obtidos do estudo da aneuploidia nas séries inter e intra de cada cruzamento

Cruzamentos	série intra		série inter	
	%aneuploidia	peso médio (g)	%aneuploidia	peso médio (g)
puro:macho E3 x fêmea E6	8%	0.94	9%	1.13
puro: macho G2 x fêmea G5	16%	0.76	18%	1.19
misto: macho E2 x fêmea G5	13%	1.10	13%	1.29
misto: macho G3 x fêmea E6	15%	1.89	14%	1.15

A utilização de um teste ANOVA (a um factor) mostrou que:

- as frequências de aneuploidia entre os componentes inter dos descendentes dos 4 cruzamentos eram significativamente diferentes a p= 0.017;

- as frequências de aneuploidia dos componentes inter dos descendentes do cruzamento misto G3xE6 e do cruzamento puro G2xG5 não eram significativamente diferentes a p= 0.05;

- as frequências de aneuploidia dos componentes inter dos descendentes do cruzamento misto E2xG5 com o cruzamento puro E3xE6 não eram significativamente diferentes a 0.08;

- as frequências de aneuploidia dos componentes inter dos descendentes do cruzamento misto G3 x E 6 com o cruzamento puro E3 xE6 eram significativamente diferentes a p=0.0069.

Os resultados obtidos, permitem-nos afirmar que:

- os juvenis, resultantes do cruzamento puro Escocês apresentam um menor grau de aneuploidia do que os juvenis resultantes dos cruzamentos que incluiram um progenitor da população GENEPHYS. Isto apesar da forte taxa de aneuploidia apresentada pelo progenitor Escocês E3;

- os juvenis resultantes do cruzamento puro GENEPHYS e dos cruzamentos híbridos, foram os que mostraram os níveis mais elevados de aneuploidia. Contudo, dentro destes, o cruzamento em que um dos progenitores foi um macho Escocês (E2), apresentou um nível de aneuploidia ligeiramente inferior aos outros, tanto nas séries intra como inter.

4. Estudo da eventual base genética na relação aneuploidia-crescimento

Entre as 24 famílias de "full-sibs" produzidas em La Tremblade (apresentadas nos materiais e métodos), 6 famílias foram seleccionadas de acordo com os diferentes valores dos pesos médios obtidos.

A estimação da aneuploidia foi efectuada em 10 animais com o peso médio intra-família e 10 animais com o peso médio inter-família (Quadro 22), para comparação dos seus níveis de aneuploidia e averiguação de uma eventual base genética neste fenómeno.

Quadro 22: Resultados obtidos do estudo da aneuploidia nas séries intra e inter famílias

Série	série intra		série inter	
	%aneuploidia	peso médio (g)	%aneuploidia	peso médio (g)
10	26%	0,59	25%	0,983
18	15%	0,751	16%	0,983
19	17%	0,906	15%	0,983
3	14%	1,012	14%	0,983
22	13%	1,222	11%	0,983
24	13%	1,488	14%	0,983

A utilização de um teste ANOVA (a um factor), mostrou que:

-as frequências de aneuploidia de todas as séries inter, das seis famílias estudadas apresentavam taxas de aneuploidia significativamente diferentes a p=0.00020751;

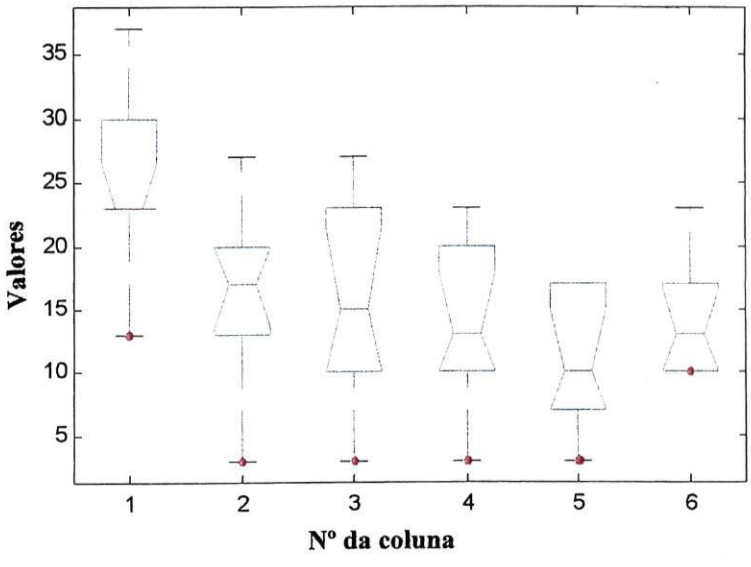


Figura 31: Boxplot realizado com os valores de aneuploidia obtidos nas séries inter das seis famílias. As diferentes colunas correspondem às diferentes classes de peso (séries inter) por ordem crescente: 0.59, 0.75, 0.90, 1.01, 1.22 e 1.48.

- as frequências de aneuploidia da série inter da família 10 não eram significativamente diferentes às frequências da aneuploidia da série intra da mesma família a p=0,51404;

- as frequências de aneuploidia da série inter da família 18 não eram significativamente diferentes às frequências da aneuploidia da série intra da mesma família a p=0,80915;

- as frequências de aneuploidia da série inter da família 19 não eram significativamente diferentes às frequências da aneuploidia da série intra da mesma família a p=0,64016;

- as frequências de aneuploidia da série inter da família 3 não eram significativamente diferentes às frequências da aneuploidia da série intra da mesma família a p=1;

- as frequências de aneuploidia da série inter da família 22 não eram significativamente diferentes às frequências da aneuploidia da série intra da mesma família a p=0,52227;

- as frequências de aneuploidia da série inter da família 24 não eram significativamente diferentes às frequências da aneuploidia da série intra da mesma família a p=0,73818;

Os resultados obtidos, permitem-nos afirmar que:

- a comparação dos valores de aneuploidia das séries inter de cada família (animais com o mesmo peso), apresenta uma diferença significativamente importante;

- a taxa de aneuploidia da família 10 (26%), família com o peso médio mais baixo era contudo à da família 24 (15%), família que apresentava o peso médio mais elevado.

Discussão

A análise dos dados obtidos neste capítulo, foi efectuada de acordo com os objectivos propostos na introdução. A comparação com os trabalhos anteriores efectuados sobre a aneuploidia em populações de *Crassostrea gigas*, diz respeito aos únicos trabalhos efectuados sobre este assunto (Thiriot-Quiévreux, 1986; Thiriot-Quiévreux *et al.*, 1988, 1992; Zouros *et al.*, 1996).

1. Comparação dos níveis de aneuploidia observados nas diferentes populações estudadas

A comparação das taxas de aneuploidia nas populações GENEPHYS resultantes dos cruzamentos 20x20 e 5x5 apresenta valores de 18% a 34%, que são significativamente superiores aos observados anteriormente por Thiriot-Quiévreux *et al.*

Quadro 23: Valores de aneuploidia obtidos anteriormente em *Crassostrea gigas*

Origem das populações estudadas * produzidas em aquacultura ** recolhidas no meio natural	Tipo de cruzamento	no. animais estudados	Comprimento ou peso da concha	Percentagem de aneuploidia	Referência
Barfleur *	"mass mating"	14		13%	T-Q., 1986
Arcachon **		27		9%	"
Seudre**		32		11%	"
Merignac **		23		25%	"
Bouin *	"mass mating"				T-Q., 1986
juvenis com crescimento rápido		80		11%	
juvenis com crescimento lento		91		26%	
Argenton *	"pair mating"				T-Q et al.,
juvenis com crescimento rápido		47	15-20mm	5%	1988
juvenis com crescimento lento		46	3-5mm	19%	
La Tremblade *	"pair mating"				T-Q et al.,
juvenis com crescimento rápido		55	15-20mm	10%	1988
juvenis com crescimento lento		55	8-10mm	27%	
La Tremblade *					não publicado
	"pair mating 1"				1988
juvenis com crescimento rápido		10	18 -22mm	6%	
juvenis com crescimento lento		10	6-8mm	14%	
	"pair mating 2"				
juvenis com crescimento rápido		10	18-22mm	9%	
juvenis com crescimento lento		10	6-8mm	25%	
	"pair mating 3"				
juvenis com crescimento rápido		10	16-21mm	7%	
juvenis com crescimento lento		10	6-8mm	21%	
	"mass mating"				
juvenis com crescimento rápido		10	15-21mm	12%	
juvenis com crescimento lento		10	7-8mm	34%	
La Tremblade *	"pair mating"				T-Q et al.,
juvenis com crescimento rápido		39	20-25mm	11%	1992
juvenis com crescimento lento		45	10-15mm	27%	
Bonne Anse **	"mass mating"				Zouros et al., 1996
juvenis com crescimento rápido		40	25-29mm	16%	
juvenis com crescimento lento		40	9-16mm	21%	

Por seu lado, a taxa de aneuploidia observada na população controlo foi significativamente inferior às taxas de aneuploidia das populações criada no âmbito do programa GENEPHYS.

Quadro 24: Resumo dos valores de aneuploidia obtidos na espécie *Crassostrea gigas* neste estudo

Origem das populações estudadas * produzidas em aquacultura ** recolhidas no meio natural	Tipo de cruzamento	no. animais estudados	Comprimento ou peso da concha	Percentagem de aneuploidia
La Tremblade *				
Pseudo-cohorte 1	20x20	40		27%
Pseudo-cohorte 2	20x20	40		34%
Pseudo-cohorte 3	20x20	40		33%
Pseudo-cohorte 4	20x20	40		28%
Port des Barques (link 2) *	5x5			
juvenis com crescimento rápido		10	40-50mm	18%
juvenis com crescimento lento		10	20-35mm	25%
Bonne Anse (link 3) *				
juvenis com crescimento rápido		10	40-50mm	19%
juvenis com crescimento lento		10	20-35mm	25%
Arcachon (link 4) *	5x5			
juvenis com crescimento rápido		10	40-50mm	22%
juvenis com crescimento lento		10	20-35mm	30%
População contrôle **				
Genitores escoceses, Argenton	"mass mating"			
juvenis de todos os tamanhos		11	35-47mm	3%
juvenis com crescimento rápido		15	78-96mm	5%
juvenis com crescimento lento		15	45-66mm	16%
Port des Barques *	5x5			
Experiência de Bouin				
juvenis com crescimento rápido		12	74.7-94.2 gr	6%
juvenis com crescimento médio		12	46.9-59.3 gr	17%
juvenis com crescimento lento		12	22.9-36.8 gr	22%

Esta diferença na percentagem de aneuploidia observada, poderá ser explicada :

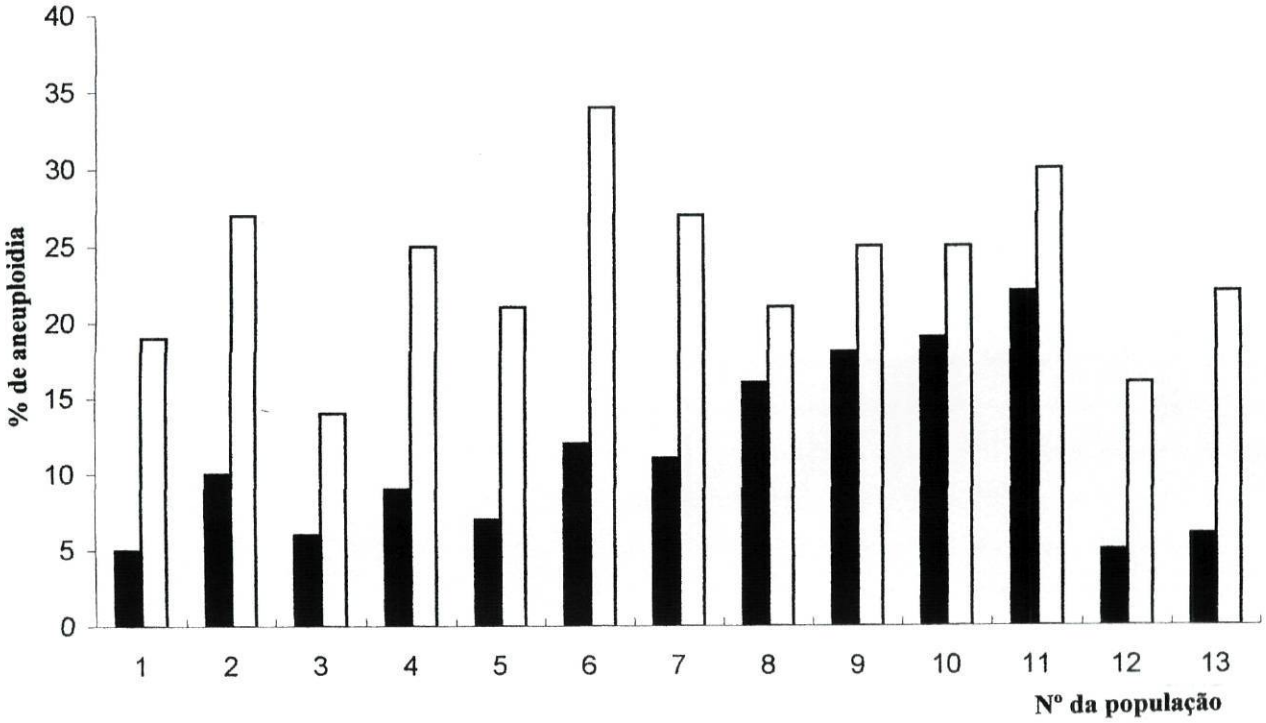
- pelas diferentes condições ambienciais de cultura, o que justificaria as diferenças observadas entre as populações de GENEPHYS e de Argenton, mas que não explica os valores significativamente diferentes observados entre os descendentes do cruzamento 20x20, que tiveram as mesmas condições iniciais de cultura;

- outra hipótese seria a da presença de um "background" genético diferente (entre famílias ou populações).

A distinção entre factores genéticos e ambienciais não é fácil de estabelecer a este nível de análise.

2. Relação aneuploidia-crescimento

Neste trabalho foi confirmada a correlação negativa entre a taxa de crescimento e o nível de aneuploidia (hipodiploidia) somática, observada em resultados anteriores, na população de Argenton, nas populações dos cruzamentos 5x5, e na população de Bouin onde foi particularmente significativa (Figura 32).



1-População de Argenton (1988); 2 a 6- População de La Tremblade (1988); 7- População de La Tremblade (1992); 8- População de Bonne Anse (1996); 9-População 5x5 de Port des Barques (este estudo, GENEPHYS); 10- População 5x5 de Bonne Anse (este estudo, GENEPHYS); 11- População 5x5 de Arcachon (este estudo, GENEPHYS); 12- População de Argenton (este estudo, GENEPHYS); 13- Experiência de Bouin, população 5x5 de Port des Barques (este estudo, GENEPHYS). Populações 1 a 8: dados de Thiriot-Quiévreux; 9 a 13: este estudo, GENEPHYS.

Figura 32: Comparação dos valores da aneuploidia em animais de crescimento lento (a preto) e de crescimento rápido (a branco) em diferentes populações de *Crassostrea gigas* (Thiriot-Quiévreux *et al.*, em preparação).

A realização de um teste ANOVA nas 13 famílias estudadas, mencionadas no histograma, para a comparação dos valores de aneuploidia dos animais de crescimento rápido e dos animais de crescimento lento, mostrou que estes são significativamente diferentes a p = 0.000010437 (o valor obtido anteriormente para o cruzamento 5x5 de Arcachon, não muda portanto o significado da totalidade dos dados).

Este efeito da aneuploidia somática sobre o crescimento poderá ser explicado, pelas seguintes hipóteses:

1-Introdução de uma pseudo-dominância de genes deletérios

Genes deletérios recessivos, através da haploidização progressiva das células somáticas, por perda de cromossomas nos casos de aneuploidia, passariam a exprimir-se. Esta hipótese é apoiada pela observação do crescimento acelerado em bivalves poliploides, produzidos artificialmente, uma vez que a expressão de genes deletérios recessivos por perda de cromossomas ao acaso seria seguramente mais difícil nesses animais (Zouros *et al.*, 1996).

2-Alteração do índice de heterozigotia, induzido pela aneuploidia

Um locus cromossómico, monomórfico ou polimorfico, pode ser homozigótico ou heterozigótico num par de cromossomas. Nos bivalves, a maior parte dos estudos genéticos efectuados, puseram em evidência um déficit de heterozigotia num ou em vários loci. Embora o(s) mecanismo(s) de produção deste déficit de heterozigotia neste grupo não sejam ainda bem conhecidos, diversas hipóteses foram sugeridas: fecundação entre parentes de gerações sucessivas (inbreeding), efeito de Whalung (subdivisão de uma grande população), selecção, presença de um alelo nulo e o fenómeno da aneuploidia (Singh e Green, 1984; Toro e Vergara, 1995).

3-Fraca taxa de crescimento devida à falta da mesma função genética num grande número de células.

Esta hipótese implicaria que houvesse perda do(s) mesmo(s) cromossoma(s) nas diferentes células.

Nas duas populações estudadas, população de Argenton e população GENEPHYS, a variação individual da taxa de crescimento esteve sempre relacionada com o índice de aneuploidia. Esta relação, índice de aneuploidia-taxa de crescimento, parece então não ser específica de uma população.

No entanto, resta saber se a taxa de aneuploidia em si é específica de uma população e, nesse caso, se essa especificidade será devida a causas genéticas ou a condições ambienciais comuns.

3. Transmissão da aneuploidia

Consideramos ser de importância económica relevante investigar a possível transmissão da aneuploidia, na espécie *Crassostrea gigas,* comercializada em todo o mundo. O estudo desta possível transmissão, foi aqui efectuado, através da avaliação da aneuploidia em progenitores (G1) provenientes de populações que mostraram possuir níveis significativamente diferentes de aneuploidia (populações GENEPHYS e população controlo de Argenton, ver resultados), e do posterior estudo dos juvenis, obtidos por cruzamentos puros e mistos, efectuados entre estas duas populações.

Este estudo permitiu-nos concluir que existe um caracter genético associado à origem geográfica das populações, na medida em que:

- os animais originários da população controlo de Argenton, são menos aneuploídes do que os animais das populações experimentais de GENEPHYS, com excepção do macho Escocês 3, cuja alta taxa de aneuploidia pode ser devida a factores ambienciais;

- os descendentes dos cruzamentos puros de Argenton, mantiveram um nível pouco elevado de aneuploidia, enquanto que os descendentes do cruzamento puro GENEPHYS, mostraram um nível mais elevado. Os descendentes dos cruzamentos híbridos apresentaram níveis de aneuploidia intermediários, mais próximos dos valores dos descendentes dos cruzamentos puros GENEPHYS.

No entanto, a determinação do caracter hereditário deste fenómeno, não pôde ser efectuada devido ao baixo número de animais G1, para os quais foi possível estimar o nível da aneuploidia.

Com efeito, os animais G1 estudados apresentaram um número reduzido de mitoses. Isto foi seguramente devido ao facto de que animais adultos em época de reprodução, apresentam um índice mitótico muito baixo.

Foi aliás por esta razão, que tínhamos decidido estudar previamente a aneuploidia nos animais G1 num estado mais jovem, por um método não destructivo (cf resultados-biopsia). Mas, infelizmente, também nesse caso obtivemos um número reduzido de mitoses, devido quer ao pequeno tamanho do material biopsado, quer à

incorporação da colquicina efectuada de um forma passiva, ou talvez mesmo à má condição dos animais.

4. Base genética na relação aneuploidia-crescimento

A averiguação da existência de uma base genética na relação aneuploidia – crescimento, foi efectuada através do estudo da aneuploidia num grupo de 6 famílias de "full-sibs", seleccionadas segundo os seus pesos médios intra família e criadas nas mesmas condições.

Os resultados obtidos, da comparação dos níveis de aneuploidia dos elementos da série inter de cada família, levam-nos a apoiar a hipótese da existência de uma base genética na relação aneuplodia-crescimento. Visto que animais que apresentavam exactamente o mesmo peso e a mesma idade (grupos inter), mostraram ter percentagens significativamente diferentes de aneuploidia, sugerindo que a determinação do nível deste fenómeno é intrínseca á família.

As relações entre a taxa de crescimento e factores genéticos, neste caso o fenómeno da aneuploidia por perda de cromossomas, aqui confirmada, poderão constituir informações importantes para a cultura de espécies de bivalves com interesse comercial.

Conclusão

Os resultados obtidos neste capítulo:

1. Não permitiram a obtenção de uma resposta conclusiva, no que diz respeito á averiguação do caracter hereditário do fenómeno da aneuploidia, assim como no estudo da aneuploidia por um método não destructivo: biopsia.

2. Permitiram confirmar os resultados previamente obtidos, no que diz respeito:
   - à presença de uma percentagem considerável de células aneuploides (hipodiploides) nos tecidos somáticos da espécie de ostra *Crassostrea gigas*;
   - à existência de uma correlação negativa entre o nível de hipodiploidia e a taxa de crescimento nesta espécie (especialmente posta em evidência nos animais da experiência da população de Bouin, nos quais esta correlação foi particularmente significativa).

3. Permitiram concluir, pela primeira vez, que existe:
   - um carácter genético associado à origem geográfica das populações;
   - uma base genética na relação aneuploidia-crescimento.

Synthèse: Chapitre II - Le phénomène d'aneuploïdie dans l'espèce *Crassostrea gigas.*

Dans le cadre du programme européen GENEPHYS, dont le but était d'étudier les bases génétiques et la variabilité des caractères physiologiques impliqués dans la croissance de *C. gigas*, notre contribution a concerné l'étude du phénomène d'aneuploïdie (l'aneuploïdie est définie par l'état d'une cellule qui ne possède pas un nombre entier de lot chromosomique) selon quatre objectifs:

- étude de l'aneuploïdie dans les populations cultivées au sein du programme GENEPHYS;
- étude de l'aneuploïdie dans une population naturelle de contrôle;
- étude de l'hypothèse de la transmission de l'aneuploïdie;
- étude de l'éventuelle base génétique dans la relation aneuploïdie-croissance.

Les populations étudiées ont été obtenues à partir de croisements effectués au Laboratoire Génétique et Pathologie (IFREMER, La Tremblade). L'estimation de l'aneuploïdie a été réalisée par comptage au microscope de 30 métaphases par animal, sélectionnées au hasard et montrant une dispersion des chromosomes la plus homogène possible.

Les résultats obtenus nous ont permis de confirmer la présence d'un taux de cellules aneuploïdes dans toutes les populations de *C. gigas*. Les populations cultivées (croisements 20x20 et 5x5) au sein du programme GENEPHYS ont un taux d'aneuploïdie de 18 à 34 %. La population naturelle de contrôle (géniteurs originaires d'Ecosse, reproduction à la Station IFREMER d'Argenton, élévage à La Sation IFREMER de Bouin) montre un taux d'aneuploïdie de 3 a 16% selon les animaux étudiés. La population d'un croisement 5x5 (Port des Barques) élevée à la Station de Bouin a un taux d'aneuploïdie de 6 a 22% selon les animaux étudiés. Ces différences dans les taux d'aneuploïdie peuvent être dues soit à des facteurs environnementaux soit à une cause génétique.

Le caractère constant de la relation aneuploïdie-croissance a pu être observé dans toutes les populations étudiées: les animaux à croissance rapide ont un taux

d'aneuploïdie inférieur à celui des animaux à croissance lente. Cette relation a été observée dans huit populations étudiées précédemment (Thiriot-Quievreux *et al.*) et dans cinq populations de GENEPHYS. Les valeurs du taux d'aneuploïdie des animaux à croissance rapide et ceux des animaux à croissance lente sont significativement différentes ($p = 0,0001$). La corrélation aneuploïdie-croissance est particulièrement frappante chez les animaux du croisememt 5x5 élevés à Bouin où la croissance a été suivie individuellement.

L'étude de l'hypothèse de la transmission de l'aneuploïdie a été étudiée sur le suivi de deux générations. Des essais d'estimation de l'aneuploïdie des G1 par une méthode non destructive (biopsies) n'ont pas donné de résultats positifs dus au faible nombre de mitoses observables. L'aneuploïdie des parents G1 (géniteurs de GENEPHYS et géniteurs d'Ecosse dont les populations montraient des taux différents d'aneuploïdie) a donc été estimée par une méthode destructive réalisée tout de suite après les croisements. Quatre croisements ont pu être effectués pour l'obtention des G2. Le caractère héréditaire du phénomène d'aneuploïdie n'a pu être déterminé étant donné le faible nombre de G1 dans lesquels l'aneuploïdie a été étudiée (indice mitotique très faible des animaux en reproduction). Par contre, le caractère génétique associé à l'origine géographique des parents peut être suggeré.

L'étude de la base génétique éventuelle de la relation aneuploïdie-croissance a été effectuée dans six familles de jumeaux montrant des poids extrêmes et des poids intermédiaires au sein de l'ensemble de 24 familles de jumeaux produites simultanémemt par le Laboratoire Génétique et Pathologie (IFREMER, La Tremblade). Dans ces six familles, deux séries d'animaux ont été étudiées: la série "intra" où les animaux ont été sélectionnés avec un poids moyen intra-famille, et la série "inter" où les animaux avaient un poids moyen inter-familles. Les animaux des séries "inter" ont montré des taux d'aneuploïdie significativement différents ($p = 0,0001$), ce qui permet de proposer une base génétique de la relation aneuploïdie-croissance.

Cependant, il reste à déterminer la part respective des facteurs génétiques et environnementaux impliqués dans ce phénomène.

Capítulo III

Aplicação da identificação cromossómica ao estudo do fenómeno da aneuploidia na espécie *Crassostrea gigas*

Introdução

Como se viu no primeiro capítulo, o cariótipo da espécie *Crassostrea gigas* (Thiriot-Quiévreux, 1984) é constituído por 10 pares de cromossomas metacêntricos. A técnica de coloração padrão pelo Giemsa só permite a diferenciação destes cromossomas pelo seu tamanho decrescente, sendo os pares de cromossomas de tamanho intermediário facilmente confundidos.

Esta incapacidade de distinguir com precisão os vários pares de cromossomas homólogos, de os identificar individualmente, representou o obstáculo principal para a obtenção de um melhor conhecimento do fenómeno da aneuploidia, estudado no capítulo anterior.

A identificação do(s) cromossoma(s) ausente(s) nas diferentes células permitir-nos-á concluir se se trata de um fenómeno independente entre as diferentes células, caso de diferentes cromossomas ausentes. De acordo com esta hipótese, o efeito da aneuploidia somática no crescimento teria por base o acumular da perda de diferentes funções genéticas. No caso do(ou dos) cromossoma(s) ausente(s) se revelar sempre o(s) mesmo(s) em todas as células, o efeito da aneuploidia sobre o crescimento seria então devido à falta da mesma função genética num grande número de células (Thiriot-Quiévreux *et al.*, 1992).

O fenómeno de aneuploidia na espécie humana, foi já alvo de vários estudos (*e.g.* Wenger *et al.*, 1984). No entanto, existem ainda algumas questões sem resposta, e uma das principais é a de averiguar se todos os cromossomas estarão envolvidos de igual maneira, ou se existem alguns pares particularmente susceptíveis ao fenómeno de não disjunção. Como foi dito no capítulo anterior, a não disjunção é a principal causa da aneuploidia.

Nos casos de hipodiploidia, em humanos, a perda cromossómica parece ser inversamente proporcional ao comprimento relativo dos cromossomas (Brown *et al.*, 1983; Wenger *et al.*, 1984; Martin *et al.*, 1990).

Brown *et al.* (1983) sugeriram que a não disjunção mitótica ou meiótica, responsável pela aneuploidia, favoreceria a sobrevivência preferencial de células que tivessem perdido um cromossoma de pequeno tamanho, em detrimento daquelas que tivessem perdido um cromossoma de grande tamanho, na medida em que a perda de genes seria inferior no primeiro caso.

É também possível que o atraso na ascenção anafásica afecte preferencialmente os cromossomas mais pequenos (Martin *et al.*, 1990).

Os cromossomas de pequeno tamanho, apresentam igualmente menos quiasmas durante a meiose I. Logo, é mais provável que sejam eles a sofrer a não disjunção (Verma, 1990).

Torna-se evidente que um melhor conhecimento do fenómeno da aneuploidia nos bivalves, no nosso caso particular na espécie *Crassostrea gigas*, só poderá então ser obtido, através da utilização de uma técnica de marcação dos cromossomas, que permita a identificação individual de cada par de homólogos.

Neste capítulo vamos aplicar a técnica de marcação cromossómica pelas bandas G a cariótipos aneuploides da espécie *Crassostrea gigas*, com o **objectivo** de obter uma melhor compreensão da origem e do efeito negativo da aneuploidia sobre a taxa de crescimento.

Material e Métodos

Material

25 animais da espécie *Crassostrea gigas* foram enviados para o Observatório Oceanológico de Villefranche sur Mer, pelo "Laboratoire Génétique et Pathologie" (IFREMER, La Tremblade) onde foram previamente acondicionados.

Métodos

Uma vez no laboratório, as preparações cromossómicas e as bandas G foram obtidas de acordo com as técnicas referidas e descritas no capítulo I.

Das várias mitoses observadas após o tratamento com o método para a obtenção de bandas G, foram seleccionadas as aneuploides. Destas, foram escolhidas aquelas que apresentavam os cromossomas com um grau de contracção adequado para uma boa visualização das bandas G. Foram efectuados 23 cariótipos.

Resultados

A observação dos 23 cariótipos aneuploides efectuados (figura 33), permitiu-nos identificar os cromossomas ausentes nos casos de aneuploidia e a percentagem de perda destes (quadro 25).

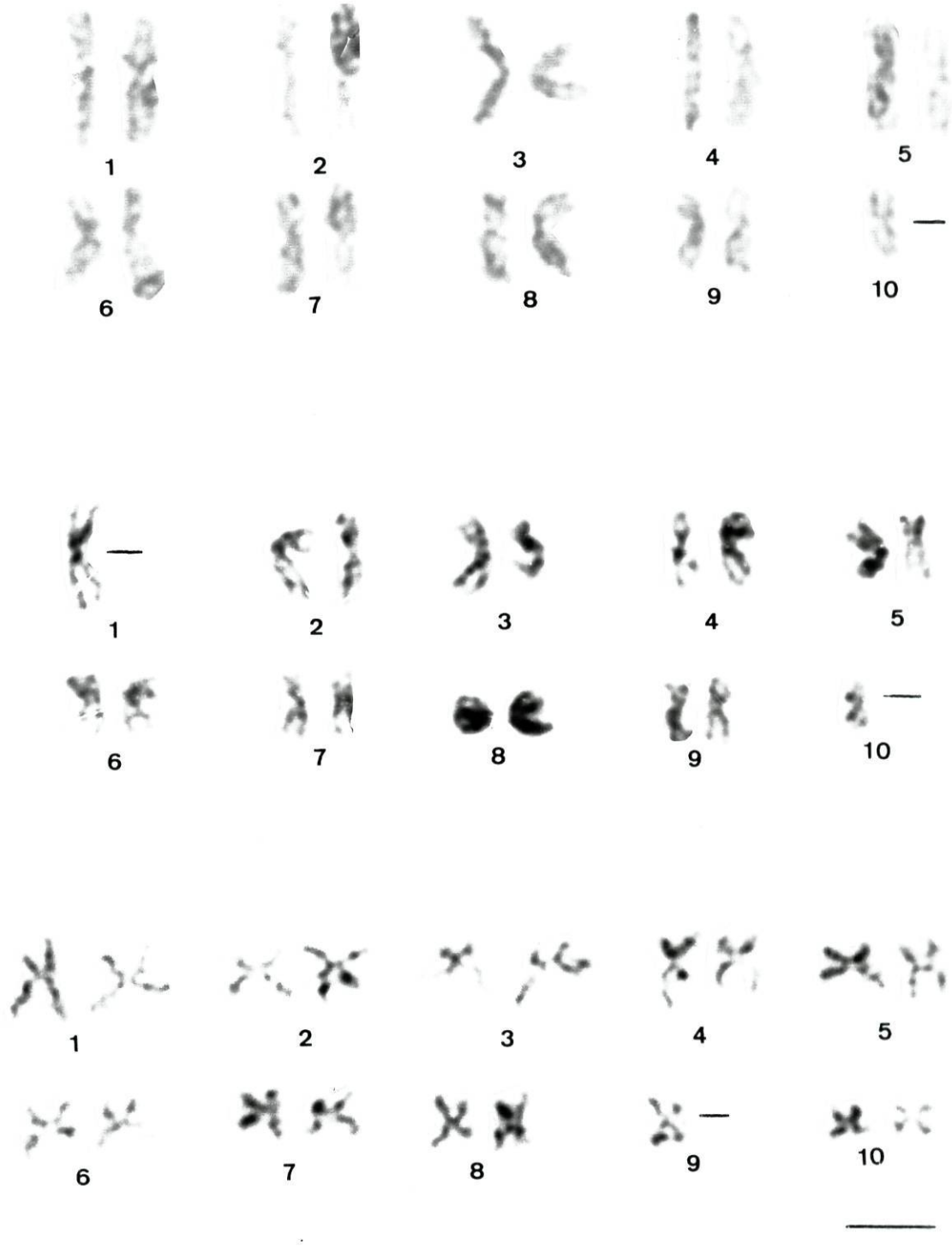


Figura 33: Cariótipos aneuploides de *Crassostrea gigas* com marcação pelas bandas G. Barra de escala=5µm.

Quadro 25: Percentagens de perda dos diferentes pares ausentes em casos de aneuploidia, na espécie *Crassostrea gigas*.

Cromossomas ausentes em casos de aneuploidia, na espécie *Crassostrea gigas*	
par nº	%
1	58%
5	17%
9	42%
10	33%

Pela observação do quadro podemos concluir que 3 pares de cromossomas (nº 1, 9 e 10) são preferencialmente perdidos em casos de aneuploidia.

Discussão

O tamanho da população aqui estudada, não foi suficientemente grande para se poderem retirar conclusões estatísticamente válidas.

No entanto, foi possível verificar que todos os casos de aneuploidia que observámos, corresponderam a casos de hipodiploidia. Esta observação não nos surpreendeu, uma vez que a hipodiploidia parece ser, em regra geral, mais frequente do que a hiperdiploidia, como por exemplo nos humanos (Brown *et al.*, 1983; Wenger *et al.*, 1984; Martin *et al.*, 1990).

Foram igualmente observados esporadicamente neste trabalho, casos de aneuploidia em outras espécies de *Crassostrea*, nomeadamente nas espécies *Crassotrea virginica* e *Crassostrea angulata*. Embora não tenhamos feito um estudo aprofundado deste fenómeno nestas duas espécies, as mitoses aneuploides observadas eram do tipo hipodiploide. A observação neste estudo de um número mínimo de 30 mitoses por animal, permitiu-nos afastar a hipótese de que a perda cromossómica se devesse a artefactos da técnica de suspensão celular.

As perdas cromossómicas nos pares nº 1, 9 e 10, nas proporções de 58%, 42% e 33% respectivamente, levam-nos a sugerir as seguintes hipóteses:

I - Perda cromossómica relacionada exclusivamente com o tamanho.

Esta hipótese justificaria a perda cromossómica nos pares 9 e 10 devida ao seu pequeno tamanho, de acordo com a existência de uma relação directa entre pequeno tamanho e perda cromossómica observada em humanos (Brown *et al.*, 1983; Wenger *et al.*, 1984; Martin *et al.*, 1990). No entanto, esta hipótese por si só é insuficiente para explicar os altos níveis de perda cromossómica observados no par nº1.

II - Genes com funções específicas envolvidas no crescimento.

Dada a elevada percentagem de cromossómica nos pares nº 1, 9 e 10, podemos sugerir que estes pares contêm genes com funções específicas envolvidas no crescimento.

III- Genes com funções específicas envolvidas no crescimento e tamanho cromossómico

Outra hipótese seria a de que apenas o cromossoma do par nº1 contenha genes com funções específicas envolvidas no crescimento, e que a perda dos cromossomas dos pares 9 e 10 seja atribuída ao seu pequeno tamanho.

IV - Presença de organizadores nucleolares e não disjunção

Nesta espécie, as regiões dos organizadores nucleolares localizam-se numa posição sub-terminal num só par, par nº10 (ver capítulo I). As NORs aparecem em homozigotia numa proporção elevada e baixa em aparente heterozigotia (6%) (Thiriot-Quiévreux e Insua, 1992). Esta aparente heterozigotia pode, de facto, corresponder a uma homozigotia. Neste caso, a presença de Ag-NORs apenas num dos cromossomas do par nº 10, seria resultante do facto de uma das NORs ter um tamanho tão pequeno que se encontre no limiar do poder de resolução do microscopio óptico, só podendo ser perceptível ao microscópio electrónico.

O envolvimento dos cromossomas portadores de NORs em associações somáticas (associações de cromossomas nucleolares ou de NORs), encontra-se bem descrito na espécie humana (Ferguson-Smith e Handmaker, 1961; Ohno *et al.*, 1961; Verma *et al.*, 1983a; Babu e Verma, 1985). Tendo sido também observado em vertebrados inferiores, como nos peixes (Crossman e Rab, 1996).

Tem sido defendido que a ligação entre os cromossomas nucleolares e, por consequência a estabilidade das suas associações, é feita pelas fibras de cromatina das NORs de que são portadores, a qual se encontra num estado particular de descondensação. De facto, por hibridação *in situ* foi possível encontrar rDNA nas fibras responsáveis pela ligação entre os cromossomas envolvidos nas associações de NORs (Henderson *et al.*, 1973), fibras essas que coravam pela prata quando se fazia a coloração Ag-NOR (Henderson *et al.*, 1973; Schwarzacher e Wachtler, 1983; Verma, 1983a).

A principal função destas associações de cromossomas nucleolares parece ser a de cooperação de duas ou mais NORs na formação de um mesmo núcleolo (Schwarzacher e Wachtler, 1983).

A correlação entre as associações de NORs e o fenómeno da não disjunção, apesar de controversa (Teysi, 1975), é defendida pela maioria dos autores (Lindenbaum

et al., 1985; Hassold *et al.*, 1987; Lee Gould *et al.*, 1987). Assim, o fenómeno da associação de NORs e a sua relação com a não disjunção poderiam ser uma das justificações para os altos níveis de perda cromossómica observados no par nº10. No entanto, esta hipótese por si só é insuficiente para explicar a perda cromossómica observada nos pares nº 1 e 9.

Conclusão

Recordamos que, neste capítulo, não podemos tirar conclusões estatisticamente válidas, pois dispomos de uma população muito pequena.

Este facto não nos impede, no entanto, de formular as hipóteses levantadas na discussão, uma vez que as proporções de perda dos cromossomas dos pares nº 1, 9 e 10 são evidentes.

Os resultados obtidos permitiram-nos também lançar as bases para uma melhor compreensão do fenómeno de aneuploidia na espécie *Crassostrea gigas*. No entanto, é necessária a observação de um maior número de mitoses aneuploides, marcadas com as bandas G para a clarificação deste fenómeno, a qual implicará a confirmação e rejeição de alguma(s) da(s) hipótese(s) apresentadas na discussão.

Synthèse: Chapitre III – Apport de l'identification des chromosomes au phénomène de l'aneuploïdie.

L'application de la technique de marquage en bandes G (présentée dans le chapitre I) permet d'identifier individuellement chaque paire de chromosomes homologues du caryotype de *C.gigas*, donc de repérer le ou les chromosomes manquants dans les caryotypes aneuploïdes (chapitre II).

Cette partie présente donc les premiers résultats obtenus dans l'identification des chromosomes manquants observés dans les populations de *C.gigas*.

Les résultats obtenus à partir de 23 caryotypes aneuploïdes marqués en bandes G montrent que les pourcentages de pertes des chromosomes sont localisés principalement sur les paires 1 (58%), 9 (42%) et 10 (33%).

Ceci nous amène à suggérer les hypothèses suivantes:

- la perte des chromosomes peut être due à la taille des chromosomes. En effet, les observations sur l'aneuploïdie des chromosomes humains montrent que les chromosomes de petite taille sont perdus préférentiellement. La perte des chromosomes des paires 9 et 10, les plus petites du caryotype, pourrait ainsi s'expliquer.
- une association entre la présence des NORs et la non disjonction mitotique ou meiotique a été mise en évidence chez l'Homme. La paire 10, porteuse des NORs, pourrait donc subir une perte préférentielle.
- la perte de chromosomes serait associée à la perte de gènes ayant des fonctions impliquées dans la croissance. Cela impliquerait que les gènes soient localisés seulement sur la paire n°1 de grande taille ou dans les paires 1, 9 et 10.

L'observation d'un plus grand nombre de mitoses aneuploïdes marquées en bandes G est nécessaire pour clarifier ce phénomène.

Conclusões gerais e perspectivas

Conclusões gerais e perspectivas

Os resultados obtidos nas experiências realizadas para identificação dos cromossomas, permitiram confirmar a composição do cariótipo e a localização das regiões dos organizadores nucleolares das espécies *Crassostrea gigas e Ostrea edulis,* bem como de estabelecer os cariótipos padrão de *Crassostrea angulata*, *Crassostrea virginica* e *Crassostrea rhizophorae.*

Foram obtidos resultados originais no que diz respeito (I) ao estabelecimento dos cariótipos das espécies: *Crassostrea ariakensis*, *Crassostrea gasar*, *Crassostrea sikamea* e *Saccostrea commercialis,* e (II) à localização das regiões dos organizadores nucleolares nas espécies: *Crassostrea angulata, Crassostrea virginica*, *Crassostrea rhizophorae*, *Crassostrea ariakensis, Crassostrea gasar, Crassostrea sikamea* e *Saccostrea commercialis.*

A análise cariológica comparativa (efectuada através da Análise de componentes principais e Classificação ascendente hierárquica), das oito espécies de ostras rugosas estudadas, colocou em evidência o isolamento de *C.gasar* e de *C. rhizophorae* das outras espécies e a distinção de dois grupos nas restantes: o primeiro constituído por *C. gigas*, *C. angulata* e *C. sikamea* e o segundo por *C. ariakensis*, *C. virginica* e *S. commercialis*. A localização das NORs permitiu a diferenciação de espécies que possuíam cariótipos próximos.

A identificação das regiões de heterocromatina, na espécie *Ostrea edulis,* através do método das bandas C, mostrou marcação positiva em três pares cromossómicos (nº1, 4, e 10).

A identificação individual de cada par de cromossomas homólogos, foi obtida pela marcação pelas bandas G, nas espécies *Crassostrea gigas, Crassostrea angulata* e *Crassostrea virginica.* A análise comparativa da marcação em bandas G nestas três espécies mostrou que o modelo das principais bandas era próximo, apresentando, no entanto, uma semelhança mais forte entre os de *Crassostrea gigas* e *Crassostrea angulata* do que entre estes dois e o de *Crassostrea virginica.*

O modelo em bandas G na espécie *Ostrea edulis* e os modelos em bandas R nas espécies *Crassostrea gigas, Crassostrea angulata, Crassostrea virginica e Ostrea edulis,* são ainda preliminares devido ao pequeno número, de mitoses marcadas positivamente por estas bandas, obtido.

A totalidade destes resultados contribui para um melhor conhecimento da citotaxonomia das ostras e das suas relações filogenéticas. Isto é particularmente importante devido ao grande interesse comercial da maior parte destas espécies, permitindo a formulação de uma melhor política de gestão dos recursos genéticos ostreícolas.

A identificação individual dos cromossomas pelas técnicas de marcação pelas bandas G, permite a detecção de alterações numéricas e estruturais nestas espécies. Isto poderá ser útil no estudo de ostras expostas a poluentes, doenças e experiências de manipulação genética.

Os resultados do estudo do fenómeno da aneuploidia obtidos, na espécie *Crassostrea gigas,* permitiram confirmar a presença de uma taxa de células aneuploides em todas as populações estudadas. As populações cultivadas, no âmbito do programa GENEPHYS, mostraram uma taxa de aneuploidia (18 a 34%) muito superior à da população natural de controlo (3 a 16%).

O carácter constante da relação aneuploidia-crescimento pôde ser observado em todas as cinco populações aqui estudadas (sendo particularmente evidente na população de Bouin). Os animais de crescimento rápido apresentaram sempre um nível de aneuploidia inferior aos animais de crescimento lento. Os valores de aneuploidia dos animais com crescimento rápido e os valores de aneuploidia dos animais com crescimento lento, mostraram ser significativamente diferentes ($p=0.000010437$).

O carácter hereditário do fenómeno da aneuploidia não pode ser determinado devido ao baixo número de genitores, para os quais foi possível estimar o nível daquele fenómeno (índice mitótico muito fraco dos animais em reprodução). No entanto, pôde ser sugerida a existência de um carácter genético associado à origem geográfica das populações.

O estudo da eventual base genética da relação aneuploidia-crescimento, foi efectuado em seis famílias de "full-sibs". Os animais das séries inter apresentaram níveis de aneuploidia significativamente diferentes ($p=0.00020751$), o que permitiu sugerir uma base genética para a relação aneuploidia–crescimento. Resta, no entanto, determinar se há ou não uma influência preponderante dos factores genéticos ou ambienciais nesta relação.

A confirmação do carácter constante da relação aneuploidia crescimento e a evidência de uma base genética nesta relação, podem ser de grande utilidade para as culturas desta espécie.

Isto é particularmente importante, porque neste momento as práticas ostreíquolas têm tendência a comercializar indivíduos com crescimento rápido, logo a guardar uma parte progressivamente maior de indivíduos com crescimento lento, que desta forma irão participar em maior número no recrutamento. Como foi demonstrado neste trabalho, esses indivíduos com crescimento lento são aqueles que apresentam as taxas de aneuploidia mais elevadas.

É importante determinar em futuros trabalhos, a existência de um carácter hereditário no fenómeno da aneuploidia, para evitar que as práticas ostreícolas conduzam a uma selecção negativa, reforçando a contribuição dos genitores de crescimento lento para a obtenção das futuras gerações.

O fenómeno da aneuploidia deve ser, pois, um parâmetro a considerar em programas de melhoramento genético de ostras.

Os resultados obtidos da aplicação da técnica de identificação dos cromossomas ao fenómeno de aneuploidia na espécie *Crassostrea gigas,* mostraram que as percentagens de perda cromossómica se localizavam preferencialmente nos pares 1 (58%), 9 (42%) e 10 (33%). Isto impele-nos a sugerir como hipóteses para esta perda preferencial: (I) o tamanho dos cromossomas; (II) a presença das NORs e o fenómeno de não disjunção mitótico ou meiótico, como provável consequência das associações somáticas destas; (II) a presença, nesses pares, de genes com funções específicas envolvidas no crescimento.

A observação de um maior número de cariótipos marcados pela técnica das bandas G e em diferentes gerações da espécie *C. gigas*, é necessária para clarificar as causas e mecanismos deste fenómeno.

Bibliografia

Ahmed M, (1973). Cytogenetics of oysters. Cytologia **38**, 337-346.

Ahmed M, e Sparks AK, (1967). A preliminary study of two species of oysters (*Ostrea lurida* and *Crassostrea gigas*). J. Fish. Board Can. **24**, 2155-2159.

Allen SK, e Gaffney PM, (1993). Genetic confirmation of hybridization between *Crassostrea gigas* (Thunberg) and *Crassostrea rivularis* (Gould). Aquaculture **113,** 291-300.

Allen SK, Gaffney PM, Scarpa J, e Bushek (1993). Inviable hybrids of *Crassostrea virginica* (Gmelin) and *C. rivularis* (Gould) and *C. gigas* (Thunberg). Aquaculture **113**, 269-289.

Amemiya CT, e Gold JR, (1990). Cytogenetic studies in North American minnows (Cyprinidae). XVII. Chromosomal NOR phenotypes of 12 species, with comments on cytosystematic relationship among 50 species. Hereditas **112**, 231-247.

Angelier N, Hernandez-Verdun D, e Bouteille M, (1982). Visualization of nucleolar proteines at nucleolar level. Biol. of Cell **45**, 198.

Ashburner M, (1989). *Drosophila.* A laboratory manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Babrakzai N, e Miller WB, (1984). Cytogenetic study of interspecific hybrids of *Ashmunella* (Mollusca: Pulmonata: Ploygyridae), I. *A. proxima* x *A. lenticula* F1 hybrids. Malacologia **25(2)**, 413-426.

Babu K, e Verma RS, (1985). Structural and functional aspects of nucleolar organizer regions (NORs) of human chromosomes. Int. Rev. of Cytol. **94**, 151-175.

Banks MA, Hedgecock D, e Waters C, (1993). Discrimination between closely related Pacific oyter species (*Crassostrea*) via mitochondrial DNA sequences coding for large subunit rRNA. Mol. Mar. Biol. and Biotech. **2(3)**, 129-136.

Banks MA, McGoldrick DJ, Borgeson W, e Hedgecock D, (1994). Gametic incompatibility and genetic divergence of Pacific and Kumamoto oysters, *Crassostrea gigas* and *C. sikamea.* Mar. Biol. **121**, 127-135.

Blaxhall PC, (1983). Chromosome karyotyping of fish using conventional and G-banding methods. J. Fish Biol. **22**, 417-424.

Bloom SE, e Goodpasture G, (1976). An improved technique for selective silver staining of nucleolar regions in human chromosomes. Hum. Genet. **34**, 199-206.

Bond DJ, e Chandley AC, (1983). Aneuploidy IN: Oxford University Press, Oxford.

Boudry P, Heurtebise S, Collet B, Cornette F, e Gérard A, (1998). Differentiation between populations of the portuguese oyster, *Crassostrea angulata* (Lamarck) and the pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg) revealed by mtDNA RFLP analysis. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. **226,** 279-291.

Bregman AA, (1975). Q-,C- and G-banding patterns in the germ-line and somatic chromosomes of *Miastor sp.* (Diptera:cecidomydae). Chromosoma **53**,119-130.

Buroker NE, (1983). Population genetics of the American oyster *Crassostrea virginica* along the Atlantic coast of the Gulf of mexico. Mar. Biol. **75**, 99-112.

Bull JJ, (1983). Evolution of Sex determinig mechanism. University of Texas, Austin, Texas, 316pp.

Butet A, e Volobouev VT, (1995). R- chromosomes banding study of the dark form *Sorex coronatus* from western France marshes. Mammalia **59(1)**, 103-107.

Clabby C, Goswami U, Flavin F, Wilkins NP, Houghton JA, e Powell R, (1996). Cloning, characterisation and chromosomal location of satellite DNA from Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Gene **168**, 205-209.

Coelho P, (1997). Caracterização molecular da heterocromatina centromérica e pericentromérica em *Drosophila melanogaster*. Tese de doutoramento.

Crossman EJ, e Rab P, (1996). Chromosome-banding study of the Alaska blackfish, *Dallia pectoralis* (Euteleotei: Esocae), with implications for the karyotype evolution of escoid fishes. Can. J. Zool. **74**, 147-156.

Dixon DR, (1982). Aneuploidy in mussel embryos (*Mytilus edulis* L.) originating from a polluted dock. Mar. Biol. Lett. **3**, 155-161.

Dixon DR, e MacFadzen IRB, (1987). Heterochromatin in the interphase nuclei of the common mussel *Mytilus edulis* L. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. **112**, 1-9.

Dixon DR, e MacFadzen IRB, e Sisley K, (1986). Heterochromatin marker regions (nucleolar organisers) in the chromosomes of the common mussel, *Mytilus edulis* (Molusca: Pelecypoda). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. **97**, 205-212.

Dutrillaux B, e Covic M, (1974). Étude de facteurs influençant la dénaturation thermique ménagée des chromosomes. Exp. Cell Res. **85**, 143-153.

Dutrillaux B, e Couturier J, (1983). Paléocytogénétique des Mammifères. En: Modalités, rytmes et mécanismes de l'évolution biologique. Coll. Inyernat. CNRS n°330, CNRS, Paris, 259-265.

Evans HJ, (1960). Supernumerary chromosomes in wild populations of the snail *Helix pomatia* L. Heredity **15**, 129-138.

Ferguson-Smith MA, e Handmaker SD, (1961). Observations on the satellite human chromosomes. Lancet **25**, 638-640.

Ferraro M, Archidiacono P, Pelliccia F, Rocchi M, Rocchi A e De Capoa A, (1977). Secondary constriction and nucleolus organizer regions in man. Exp. Cell Res. **104**, 428–430.

Fontana F, Tagliavini J, Congiu L, Lanfredi M, Chicca M, Laurente C e Rossi R, (1988). Karyotypic characterization of the great sturgeon, *Huso huso,* by multiple staining techniques and fluorescent *in situ* hybridization. Mar. Biol. **132**, 495-501.

Gaffney PM, e Allen SK, (1993). Hybridization among *Crassostrea gigas*: A critical review. Aquaculture **116,** 1-13.

Gallager SM, e Mann R, (1986). Growth and survival of larvae of *Mercenaria mercenaria* and *Crassostrea virginica* relative to broodstock conditioning and lipid contents of eggs. Aquaculture **56**, 105-123.

Gold JR, e Ellison JR, (1982). Silver staining for nucleolar organizing regions of vertebrate chromosomes. Stain Techn. **58**, 51-55.

Gold JR, e Li YC, (1991). Trypsin G-banding of North american cyprinid chromosomes: Phylogenetic considerations, implications for fish chromosome structure, and chromosomal polymorphism. Cytologia **56**, 199-208.

Gold JR, e Li YC, (1994). Chromosomal NOR karyotypes and genome size variation among squawfishes of the genus *Ptychocheilus* (Teleostei:Cyprinidae). Copeia **1**, 60-65.

Gonzalez C, e Glover DM, (1993). Techniques for studying mitosis in *Drosophila* in the cell cycle. A practical approach (ed. Frantes, P e brooks R), 143-175. The practical approach series, IRL Press Limited, Oxford, England.

Goodpasture C, e Bloom S, (1975). Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. Chromosoma **53**, 37-50.

Goswami U, (1992). Cytogenetical studies in *Saccostrea cucullata* from the Goa waters with special reference to chromosomal polymorphism. La Kromosomo II **66**, 2229-2239.

Grizel H, e Héral M, (1991). Introduction into France of the Japanese oyster (*Crassostrea gigas*). J. Cons. Int. Explor. Mer **47**, 339-403.

Guo X, e Allen SK, (1997). Fluorescence *in situ* hybridization of vertebrate telomeres sequences to chromosome ends of the pacific oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg. J. Shellfish Res. **16**, 87-89.

Guo XM, e Allen SK, (1997). Sex and meiosis in autotetraploid Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). Genome **40,** 397-405.

Haaf T, e Schmid M, (1984). An early stage of ZW/ZZ Sex chromosome differentiation in *Poecilia sphenops* var. *melanistica* (Poeciliidae, Cyprinodentiformes). Chromosoma **89**, 37-41.

Hare MP, e Avise JC, (1996). Molecular genetic analysis of a stepped multilocus cline in the American oyster (*Crassostrea virginica*). Evolution **50**, 2305-2315.

Harry HW, (1985). Synopsis of the supraspecific classification of living oysters (Bivalvia: Gryphaeidae and Ostreidae). The Veliger **28(2)**, 121-158.

Hassold T, Jacobs PA, e Pettay D, (1987). Analysis of nucleolar organizing regions in parents of trisomic spontaneous abortions. Hum. Genet. **76**, 381-384.

Hayes H, e Dutrillaux B, (1998). Techniques d'hybridation *in situ*. Téchniques de cytogénétique animale. INRA Editions, 85-98.

Hecht F, e Hecht BK, (1987). Aneuploidy in humans: Dimensions, demography and dangers of abnormal number of chromosomes. In: Aneuploidy, Part A: Incidence and etiology, A. A. Sandberg, ed. Alan R. Liss, Inc., New York, 9-49.

Henderson AS, Warburton D, e Atwood KC, (1973). Ribosomal DNA connectives between human acrocentric chromosomes. Nature **245**, 95-97.

Hernandez-Verdun D, Derenzini M, e Bouteille M, (1984). Relationship between the Ag-NOR proteines and ribosomal chromatin *in situ* during drug-induced RNA synthesis inhibition. J. of Ultrast. Res. **88**, 55-65.

Howell MW, e Denton TE, (1974). An ammoniacal silver stain technique specific for satellite III-DNA regions on human chromosomes. Experiencia **30**, 1364-1366.

Howell WM, e Black DA, (1980). Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. Experientia **36**, 1014-1015.

Howell WM, Denton TE, e Diamond JR, (1975). Differential staining of the satellite regions of human acrocentric chromosomes. Experientia **31**, 260-262.

Hubell HR, Laurence IR, e Hsu TC, (1979). Identification of silver binding protein associated with the cytological silver staining of actively transcribing nucleolar regions. Cell Biol. Int. Rep. **3(7)**, 615-622.

Iannuzi L, Di Meo GP, e Perucatti A, (1994). G- and R- band comparaison. Hereditas **120**, 245-251.

Iannuzi L, Di Meo GP, e Perucatti A, (1996). G- and R- banded prometaphase karyotypes in goat (*Capra hircus* L.). Caryologia **49,** 267-277.

Ieyama H, (1975). Chromosome numbers of three species in three families of Pteriomorpha. Venus, Jap. J. Malac. **33**, 63-68.

Ieyama H, (1990). Chromosomes of the oysters, *Hyotissa imbricata and Dendostrea folium* (Bivalvia:Pteriomorphia). Venus, Jap. J. Malac. **49**, 63-68.

Ieyama H, e Inaba A, (1974). Chromosome numbers of ten species in four families of Pteriomorphia (Bivalvia). Venus, Jap. J. Malac. **33**, 129-137.

Insua A, e Thiriot-Quiévreux C, (1991). The characterization of *Ostrea denselamellosa* (Mollusca, Bivalvia) chromosomes: karyotype, constitutive heterochromatine and nucleolus organizer regions. Aquaculture **97**, 317-325.

Insua A, e Thiriot-Quiévreux C, (1992). Karyotypes of *Cerastoderme edule, Venerupis pullastra* and *Venerupis rhomboides* (Bivalvia, Veneroida). Aquat. Living Resour. **5**, 1-8.

Insua A, e Thiriot-Quiévreux C, (1993). Karyotype and nucleolus organizer regions in *Ostrea puelchana* (Bivalvia, Ostreidae). Veliger **36,** 215-219.

Insua A, Labat JP, e Thiriot-Quiévreux C, (1994). Comparative analysis of karyotypes and nucleolar organizer regions in different populations of *Mytilus trossulus, Mytilus edulis* and *Mytilus galloprovincialis*. J. Moll. Stud. **60**, 359-370.

Insua A, López-Piñón J, e Méndez J, (1998). Characterization of *Aequipecten opercularis* (Bivalvia: Pectinidae) chromosomes by different staining techniques and fluorescent *in situ* hybridization. Genes Genet. Syst. **73**, 193-200.

John B, (1988). The biology of heterochromatin. En: Heterochromatin: molecular and structural aspects. R.S. Verma (ed.). Cambridge University Press, Cambridge, 1-147.

ISCN (1985). An international system for human cytogenetic nomenclature. DG Harnden e HP Klinger (eds).Basel: Karger.

Jones RN e Rees H, (1982). B Chromosomes. Academic Press Inc, London, 266pp.

Jones RN, e Puertas MJ, (1993). The B- chromosomes of Rye (*Secale cereale* L.). Frontiers in Plant Science research. KK Dhir e TS Sareen (eds). Bhagwati Enterprises, Delhi (India).

Ladron de Guevara B, Winkler F, e Palma C, (1994). Karyotype description and the position of the nucleolar organizer region (NOR) in the Chilean oyster *Tiostrea chilensis* (Philippi) Chanley and Dinamani. In: Beaumont AR, ed. Genetics and Evolution of Aquatic organisms. University of Wales, Bangor, UK, pp 399-405.

Ladron de Guevara B, Winkler F, Rodriguez-Romero F, e Palma-Rojas C, (1996). Comparative karyology of four american oyster species. Veliger **39**, 260-266.

Langdon CJ, e Robinson AM, (1996). Aquaculture potential of the Suminoe oyster (*Crassostrea ariakensis* Fugita 1913). Aquaculture **144**, 321-338.

Lebart L, Morineau A, e Picon M, (1995). Statistique exploratoire multidimensionnelle. Ed. Dunod.439pp.

Lee Gould S, e Martin De Leon PA, (1987). Brdu-Giemsa labeling studies of satellite association in parents of children with trisomic 21 or 13. Am. J. of Med. Genet. **26**, 971-981.

Levan A, Fredga K, e Sandberg AA, (1964). Nomenclature for centromere position in chromosomes. Hereditas **52**, 201-220.

Li XX, e Havenhand JN, (1997). Karyotype, nucleolus organizer regions and constitutive heterochromatine in *Ostrea angasi* (Mollusca: Bivalvia): evidence of taxonomic relationship within *Ostreidae*. Mar. Biol. **127**, 443-448.

Lindenbaum RS, Hulten M, Mc Dermott A, e Seabright M, (1985). The prevalence of translocations in parents of children with regular trisomy 21: a possible interchromosomal effect? J. of Med. Genet. **22**, 24-28.

Littlewood DJT, (1994). Molecular phylogenies of cupped oysters based on partial 28S rRNA gene sequences. Mol. Phylog. Evol. **3**, 221-229.

Longwell AC, e Stiles SS, (1996). Chromosomes, Biology and Breeding. In: VS. Kennedt VS, Newell RTE, Eble F, eds. The Eastern Oyster: *Crassostrea virginica*. College Park Maryland. Maryland Sea Grant College XVI, pp443-465.

Longwell AC, Stiles SS, e Smith DG, (1967). Chromosome complement of the American oyster *Crassostrea virginica* as seen in meiotic and cleaving eggs. Can. J. Genet. Cytol. **9**, 845-856.

Lorite P, Chica E, e Palomeque T, (1996). G-banding and chromosome condensation in the ant, *Tapinoma nigerrimum*. Chromosome Res. **4**, 77-79.

Luo C, (1999). Multiple chromosomal banding in grass carp, *Ctenopharyngodon idellus*. Heredity **81**, 481-485.

MacGregor HC, e Sessions SK, (1986). The biological significance of variation in satellite DNA and heterochromatin in newts of the genus *Triturus*: an evolutionary perspective. Phil. Trans. R. Soc. Biol. **312**, 243-259.

Malheiro I, (1989). Ultraestrutura das associações de satélites dos cromossomas acrocêntricos humanos. Tese de doutoramento.

Malheiro I, Porto B, e Goyanes V, (1989). Morphometric analysis of human chromosome satellites and NOR asymmetries by transmission electron microscopy. Cytobios **61**, 31-40.

Mallet AL, e Haley LE, (1983). Growth rate and survival in pure populations matings and crosses of the oyster *Crassostrea virginica*. Can. J. Fish. Aquat. Sci. **40**, 948-954.

Marchi A, e Rai KS, (1986). Chromosome banding homologies in three species of *Aedes* (Stegomyia). Can. J. Genet. Cytol. **28**, 198-202.

Marquez EG, (1992). Comparacion de cariotipos entre las ostras *Crassostrea virginica* (Gmelin), *C. rhizophorae* (Guilding) y *Pinctada imbricata* (Roding). Carrib. J. Sci. **28**, 51-55.

Martin RH, e Rademaker A, (1990). The frequency of aneuploidy among individual chromosomes in 6,821 human sperm chromosome complements. Cytogenet. Cell Genet. **53**, 103-107.

Martinez-Exposito MJ, Martinez- Lage A, Pasantes JJ, e Mendez J, (1992). A preliminary study of aneuploidy in natural populations in the genus *Mytilus*. Cuad. Area cienc. Mar. Semin. Estud. Galegos **6**, 49-55.

Martinez-Exposito MJ, Pasantes JJ, e Mendez J, (1994). NOR activity in larval and juvenil mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lmk). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. **175**, 155-165.

Martinez-Exposito MJ, Mendez J, e Pasantes JJ, (1997). Analysis of NORs and NORs associated heterochromatin in the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk. Chromosome Res. **5**, 268-273.

Martinez-Lage A, Gonzalez-Tizon A, e Méndez J, (1994). Characterization of different chromatin types of *Mytilus galloprovincialis* L. after C- banding, fluorochrome and restriction endonuclease treatments. Heredity **72**, 242-249.

Martinez-Lage A, Gonzalez-Tizon A, e Méndez J, (1995). Chromosomal markers in three species of the genus *Mytilus* (Molusca:Bivalvia). Heredity **74**, 369-375.

Martinez-Lage A, Gonzalez-Tizon A, Ausio A, e Méndez J, (1997). Karyotypes and Ag-NORs of the mussel *Mytilus californianus* and *M. trossulus* from the pacific Canadian coast. Aquaculture **153**, 239-249.

Matsui S, Fuke M, Chai L, Sandberg AA, e Elassouli S, (1986). N-band proteins of nucleolar organizers: mapping, subnucleolar localization and rDNA binding. Chromosoma **93**, 231-242.

Medina FJ, Solanilla E, Sanchez-Pina MA, Fernandez-Gomez ME, e Risueño MC, (1986). Cytological approach to the nucleolar functions detected by silver staining. Chromosoma **94**, 259-266.

Méndez J, Pasantes JJ, e Martinez-Exposito MJ, (1990). Banding pattern of mussel (*Mytilus galloprovincialis)* chromosomes induced by 2xSSC/Giemsa-stain treatment. Mar. Biol. **106**, 375-377.

Menzel RW, (1968). Chromosome number in nine families of marine pelecypod molluscs. The Nautilus **82**, 45-50.

Menzel RW, (1974). Portuguese and Japanese oysters are the same species. J. Fish Board. Can. **31**, 453-456.

Miklos GL, e John B, (1979). Heterochromatine and satellite DNA in man: Properties and prospects. Am. J. Hum. Genet. **31**, 264-280.

Miller DA, Tantravahi R e Miller OJ, (1976). Suppression of human nucleolus organizer activity in mouse-human somatic hybrid cells. Exp. Cell Res. **101**, 235-243.

Nakamura H, (1985). A review of molluscan cytogenetic information based on CISMOCH- Computarized index system for molluscan chromosomes. Bivalvia, Polyplacophora and Cephalopoda. Venus, Jap. J. Malac. **44**,193-225.

Namba K, Kobayashi M, Ainda S, Uematsu K, Yoshida M, Kondo Y, e Miyata Y, (1995). Persistent relaxation of the adductor muscle of oyster *Crassostrea gigas* induced by magnesium ion. Fish. Scien. **61(2)**, 241-244.

Newkirk GF, (1980). Review of the genetics and the potential for selective breeding of commercially important bivalves. Aquaculture **19**, 209-228.

O'Foighil D, Gaffney PM, e Hilbish TJ, (1995). Differences in mitochondrial 16S ribosomal gene sequences allow discrimination among American [*Crassostrea virginica* (Gmelin)] and Asian [*C. gigas* (Thunberg)] *C. ariakensis* Wakiya] oyster species. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. **192**, 211-220.

O'Foighil D, Gaffney PM, Wilbur AE, e Hilbish TJ, (1998). Mitochondrial cytochrome oxidase I gene sequences support an asian origin for the Portuguese oyster *Crassostrea angulata*. Mar. Biol. **131**, 497-503.

Ohno S, Trujillo JM, Kaplan WD, e Kinoshita R, (1961). Nucleolus organizers in the causation of chromosome anomalies in man. Lancet **ii**, 123-126.

Palma-Rojas C, Guerra R, Brown D, e Von Brand E, (1997). Quantitative karyotype of *Choromytilus chorus* (Mollusca:Bivalvia:Mytilidae). The Veliger **40(3)**, 259-262.

Pardue ML, e Gall JG, (1969). Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. Proc. Natl. Acad. Sci. **64**, 600-604.

Pasantes JJ, Martinez-Exposito MJ, e Mendez J, (1996). C-band polymorphism in the chromosomes of the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk. Caryologia **49(3/4)**, 233-245.

Rab P, Karakousis Y, e Rabova M, (1996). Karyotype, NOR phenotype and C- banding study of *Barbus cyclolepis* from Greece. Fol. Zool. **45**, 77-83.

Reeb CA, e Avise JC, (1990). A genetic discontinuity in a continuously distributed species: Mithocondrial DNA in the American oyster, *Crassostrea virginica*. Genetics **124**, 397-406.

Rodriguez-Romero F, Uribe-Alcocer M, e Laguarda-Figueras A, (1978). Cytogenetic study of an oyster population of the species *Crassostrea virginica* Gmelin from the coast of Tabasco, Mexico. Venus, Jap. J. Malac. **37**, 83-86.

Rodriguez-Romero F, Uribe-Alcocer M, e Laguarda-Figueras A, (1979a). The karyotype of *Crassostrea corteziensis* Hertlein (Mollusca:Ostreidae). Anales Centro de Ciencias del Mar y Limnologia **6**, 15-18.

Rodriguez-Romero F, Uribe-Alcocer M, Laguarda-Figueras A, e Diopotex-Chong ME, (1979b). The karyotype of *Crassostrea rhizophorae* (Guilding). Venus, Jap. J. Malac. **38**, 135-140.

Rodriguez-Romero F, Laguarda-Figueras A, Uribe-Alcocer M, e Rojas-Lara ML, (1979c). Distribution of "G" bands in the karyotype of *Crassostrea virginica*. Venus, Jap. J. Malac. **38**, 180-184.

Rossi AR, Crosetti D, Gornung E, e Sola L, (1996). Cytogenetic analysis of global populations of *Mugil cephalus* (striped mullet) by different staining techniques and fluorescent *in situ* hybridization. Heredity **76**, 77-82.

Schwarzacher HG, e Wachtler F, (1983). Nucleolus organizer regions and nucleoli. Hum. Genet. **63**, 89-99.

Schwarzacher HG , Milkelsaar AV, e Schnedl W, (1978). The nature of the Ag-staining of nucleolus organizer regions - electron and light microscopic studies on human cells in interphase, mitosis and meiosis. Cytogenet. Cell Genet. **20**, 24-39.

Seabright M, (1971). A rapid banding technique for human chromosomes. Lancet **ii**, 971-972

Sharma AK, e Sharma A, (1980). Chromosome Techniques. Third Edition, Butterworths.711pp.

Singh SM, e Green RH, (1984). Excess of allozyme homozygosity in marine molluscs and its possible biological significance. Malacologia **25(2)**, 569-581.

Sola L, Monaco PJ, e Rasch EM, (1990). Cytogenetics of bisexual-unisexual species of *Poecilia latipinna*. Cytogenet. Cell Genet. **53**, 148-154.

Stallard R, Haney NR, Frank PA, Styron P, e Juberg RC, (1981). Leukocyte chromosomes from parents of cytogenetically abnormal offspring: preliminary observations. Cytogenet. Cell Genet. **30**, 50-53.

Staiber W, (1991). Preferential pairing in the germ line limited chromosomes of *Acricotopus lucidus* (Diptera,Chironomidae). Heredity **66**, 191-201.

Stanyon R, Ardito G, Lamberti L, e Bigatti P, (1983). The banded karyotypes of *Macaca fuscata* compared with *Cercocebus aterrimus*. Folia Primatol. **41**, 137-146.

Stiles SS, e Longwell AC, (1973). Fertilization, meiosis and cleavage in eggs from large mass spawnings of *Crassostrea virginica* Gmelin, the commercial American oyster. Caryologia **26**, 253-262.

Sumner AT, (1972). A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. Exp. Cell Res. **75**, 304-306.

Sumner AT, (1990). Chromosome Banding. Unwing Hyman Ltd.

Sumner AT, (1994). Functional aspects of the longitudinal differentiation of chromosomes. Eur. J. Histochem. **38**, 91-109.

Sumner AT, Evans HJ, e Buckland RA, (1971). New technique for distinguishing between human chromosomes. Nature **232**, 31-32.

Tantravahi R, Miller DA e Miller OJ, (1976). Ag staining of nucleolus organizer regions of chromosomes after Q, C, G or R banding procedures. Cytogenet. Cell Genet. **18**, 364-369.

Taysi K, (1975). Satellite association: Giemsa banding studies in parents of Down's syndrome patients. Clin. Genet. **8**, 319-323.

Thiriot-Quiévreux C, (1984). Analyse comparée des caryotypes d'Ostreidae (Bivalvia). Cah. Biol. Mar. **25**, 407-418.

Thiriot-Quiévreux C, (1986). Étude de l'aneuploïdie dans differents naissains d'Ostreidae (Bivalvia). Genetica **70**, 225-231.

Thiriot-Quiévreux C, e Ayraud N, (1982). Les caryotypes de quelques espéces de Bivalves et de Gastéropodes marins. Mar. Biol. **70**, 165-172.

Thiriot-Quiévreux C, e Insua A, (1992). Nucleolar organiser region variation in the chromosomes of three oyster species. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. **157**, 33-40.

Thiriot-Quiévreux C, e Wolowicz M, (1996). Karyotypes of *Cerastoderma glaucum* (Bivalvia) from Baltic and Mediterranean populations. Hydrobiologia **324**, 149-155.

Thiriot-Quiévreux C, Noël T, Bougrier S, e Dallot S, (1988). Relationships between aneuploidy and growth rate in pair matings of the oyster *Crassostrea gigas*. Aquaculture **75**, 89-96.

Thiriot-Quiévreux C, Pogson GH, e Zouros E, (1992). Genetics of growth rate variation in bivalves: aneuploidy and heterozygosity effects in a *Crassostrea* family. Genome **35**, 39-45.

Toro JE, e Vergara AM, (1995). Evidence for selection against heterozygotes: Post-settlement excess of allozyme homozygosity in a cohort of the Chilean oyster, *Ostrea chilensis* philippi, 1845. Biol. Bull. Mar. Biol. Lab. Woods Hole **188(2)**, 117-119.

Utting SD, (1986). A preliminary study on growth of *Crassostrea gigas* larvae and spat in relation to dietary protein. Aquaculture **56**, 123-138.

Vassart M, Séguéla A, e Hayes H, (1995). Chromosomal evolution in Gazelles. J. Hered. **86**, 216-227.

Verma RS, (1983). Preferential association of nucleolar organising human chromosomes as revealed by silver staining technique at mitosis. Mol. Gen. Genet. **190**, 352-354.

Verma RS, (1988). Heterochromatine: Molecular and Structural aspects. Cambridge University Press, New York.

Verma RS, (1990). The Genome. VCH Publishers incorporated.

Vig BK, e Sandberg AA, (1987). Aneuploidy: Part A. Incidence and Etiology. Alan R. Liss. New York.

Vitturi R, Carbone P, e Catalano E, (1985). The chromosomes of *Pycnodonta cochlear* (Poli) (Mollusca, Pelecypoda). Biologisches Zentralblatt Band **104**, 177-182.

Wang Z, Guo X, Allen SK, e Wang R, (1999). Aneuploid pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg) as incidentals from triploid production. Aquaculture **173**, 347-357.

Warchalowska-Sliwa E, Maryanska-Nadachowska A, e Jordan M, (1978). C- and G-banding in mitotic chromosomes *of Acheta domesticus* (Orthoptera). Folia Biol. **26**, 295-306.

Ward JH, (1963). Hierarchical grouping to optimize an objective function. J. Am. Stat. Ass. **58**, 236-244.

Wenger SL, (1989). Nonmodal chromosome gain and loss in human fibroblast cultures. Cytogen. Cell Genet. **52**, 201.

Wenger SL, Golden WL, Dennis SP e Steele MW, (1984). Are the occasional aneuploid cells in peripheral blood cultures significant? Am. J. Med. Genet. **19**, 715-719.

White MJD, (1973). Animal cytology and evolution. Cambridge University Press, Cambridge, 961pp.

Zouros E, e Foltz DW, (1984a). Minimal selection requirements for the correlation between heterozigosity and growth, and for the deficiency of heterozygotes, in oyster populations. Dev. Gen. **4**, 393-405.

Zouros E, Thiriot-Quiévreux C, e Kotoulas G, (1996). The negative correlation between somatic aneuploidy and growth in the oyster *Crassostrea gigas* and implications for the effects of induced polyploidization. Genet. Res. Camb. **68**, 109-116.

Anexos

07ch/Leitão 3/31/99 2:25 AM Page 175
Kitty's HD / Malacologia 41(1) / F53912

MALACOLOGIA, 1999, 41(1): 175–186

COMPARATIVE KARYOLOGICAL STUDY OF CUPPED OYSTER SPECIES

Alexandra Leitão, Pierre Boudry, Jean-Philippe Labat &
Catherine Thiriot-Quiévreux*

ABSTRACT

Chromosomes of six cupped oyster species were studied using karyometric analysis after conventional Giemsa staining, and silver staining. Karyotypes of *Crassotrea angulata* (nine metacentric and one submetacentric chromosome pairs), *C. sikamea* (nine metacentric and one submetacentric chromosome pairs), *C. virginica* (eight metacentric and two submetacentric chromosome pairs), *C. ariakensis* (eight metacentric and two submetacentric chromosome pairs), *C. gasar* (six metacentric and four submetacentric chromosome pairs), and *S. commercialis* (eight metacentric and two submetacentric chromosome pairs) are distinguishable by the number and position of the submetacentric chromosome pair and by the location of nucleolus organizer regions. Comparative karyological analysis of these six cupped oysters and of *C. gigas* was made using a Principal Component Analysis and a Hierarchical Clustering Analysis. *Crassostrea gasar* appears isolated from the other oyster species. Then, two clusters are separated. The first one groups *C. gigas, C. angulata* and *C. sikamea,* in which *C. gigas* is plesiomorphic. The second one consists of *C. ariakensis, C. virginica* and *S. commercialis.* Results are discussed with regards to oyster species relationships based on other genetic characters and to hybridization possibilities.

Key words: cupped oyster, chromosome, karyotype, NORs, cytotaxonomy, Bivalvia.

INTRODUCTION

Chromosomes of Ostreidae have been studied in 22 species (Nakamura, 1985; Vitturi et al., 1985; Ieyama, 1990). Cupped oyster species of the genera *Crassostrea* and *Saccostrea* show a common diploid chromosome number of 2n = 20, and their karyotypes include only metacentric and submetacentric chromosomes (Table 1). Interspecific differences consist of the occurrence and differing proportions of these morphological types, identified either by observation or after chromosome measurements. Karyotype differences may be seen within a species (e.g., *C. rhizophorae;* Table 1) which could be due either to intraspecific polymorphism or to the different techniques used.

Oyster species might have become differentiated through pericentric inversions of centric shifts. However, cytotaxonomic comparison needs to be based on karyological analysis carried out by the same technique and the same worker. For example, the concentration and time of incubation in the colchicine and in the hypotonic treatment, resulting in differential condensation or elongation of chromosomes (Sharma & Sharma, 1980), vary from one author to another. Karyometric analysis brings a more quantitative method to assess chromosome morphology, but still depends on the condensation or elongation of chromosomes.

Banding techniques have been found to be very useful for the identification of individual chromosomes and also of particular regions of chromosomes. Few studies have looked at banding patterns in the chromosomes of oysters (Rodriguez-Romero et al., 1979c; Insua & Thiriot-Quiévreux, 1991; Li & Havenhand, 1997). Fluorescence *in situ* hybridization has been tested in *Crassostrea gigas* (Clabby et al., 1996; Guo & Allen, 1997). Selective staining of the nucleolus organiser regions (NORs) has been shown to have potential as a cytotaxonomic tool (e.g., Amemiya & Gold, 1990). Patterns of specific NORs have been described in five species of oysters (Thiriot-Quiévreux & Insua, 1992; Insua & Thiriot-Quiévreux, 1993; Ladron de Guevara et al., 1994). Identification of structural chromosome features is useful in hybrid breeding programs and in oyster stock conservation.

In the present study, karyotypes and NORs

*corresponding author
[1]Observatoire Océanologique, URA 2077, BP 28, 06230 Villefranche-sur-Mer, France
[2]Station IFREMER, Laboratoire de Génétique, Aquaculture et Pathologie, BP 133, 17390 La Tremblade, France

A "G" - chromosome banding study of three cupped oyster species: *Crassostrea gigas*, *Crassostrea angulata* and *Crassostrea virginica* (Mollusca:Bivalvia).

Alexandra Leitão [a,c] , Catherine Thiriot-Quiévreux [a,*], Pierre Boudry [b], Isabel Malheiro [c]

[a] Observatoire Océanologique, Université P. et M. Curie-CNRS-INSU, BP 28, 06230 Villefranche sur-Mer, France

[b] Station IFREMER, Laboratoire de Génétique et Pathologie, BP 133, 17390 La Tremblade, France

[c] Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar, Universidade do Porto, Lg. Prof. Abel Salazar 2, 4000 Porto, Portugal

Short running title: G - banding in three cupped oyster species.

* Corresponding author: C. Thiriot-Quiévreux

Tel: (33) 04 93 76 38 25, Fax: (33) 04 93 76 38 93, Email: thiriot@ccrv.obs-vlfr.fr

Abstract - The G-banding technique was performed on chromosomes from gill tissue of three cupped oyster species: *Crassostrea gigas, Crassostrea angulata* and *Crassostrea virginica*. Identification of the ten individual chromosome pairs was obtained. Comparative analysis of G-banded karyotypes of the three species showed that their banding patterns generally resembled each other, with chromosome pair 3 being similar in all three species. However, differences from one species to another were also observed. The G-banding pattern highlighted greater similarities between *C. gigas* and *C. angulata* than between these two species and *C. virginica,* thus providing an additional argument for genetic divergence between these two evolutionary lineages. *C. gigas* and *C. angulata* showed a different G-banding pattern on the two arms of chromosome pair 7, which agrees with their taxonomic separation. The application of this banding technique offers a new approach to specific problems in oyster taxonomy and genetics.

Key-words: **chromosome / G-banding / *Crassostrea gigas* / *Crassotrea angulata* / *Crassostrea virginica***

Résumé - Etude du marquage chromosomique en bandes G chez trois espèces d'Huîtres Creuses: *Crassostrea gigas*, *Crassostrea angulata* et *Crassostrea virginica*. Le marquage chromosomique en bandes G a été réalisé sur des chromosomes obtenus à partir de tissu branchial de trois espèces d'Huîtres Creuses, *Crassostrea gigas, Crassostrea angulata et Crassostrea virginica*, et a permis l'identification des dix paires de chromosomes de ces espèces. L'analyse comparée des caryotypes marqués en bandes G a montré que les principales bandes G présentaient un modèle proche chez les trois espèces, la paire de chromosome 3 étant identique. Cependant quelques différences ont pu être

observées. Les caryotypes de *C. gigas* et *C. angulata* ont révélé plus de similitudes entre eux qu'avec celui de *C. virginica*. Ceci apporte un argument supplémentaire à la divergence génétique entre ces deux lignées évolutives. *C. gigas* et *C. angulata* montrent un marquage en bandes G différent sur les deux bras de la paire du chromosome 7, ce qui corrobore leur séparation taxinomique. L'application de cette technique apporte une nouvelle approche pour la taxinomie et la génétique des Huîtres.

Mots clés: **chromosome / bandes G / *Crassostrea gigas* / *Crassotrea angulata* / *Crassostrea virginica***

Aneuploidia nas séries inter e intra, de cada cruzamento efectuado para obtenção de G2.

Séries INTRA

Animal #	Nº total de mitoses estudadas	Nº total de mitoses 2n=20	Nº total de mitoses aneuploides	% individual de aneuploidia	Peso do animal(g)
Série E2xG5 INTRA					
1	30	24	6	20%	1.271
2	30	24	6	20%	1,255
3	30	27	3	10%	1,296
4	30	29	1	3%	1,719
5	30	26	4	13%	1,299
6	30	28	2	7%	1,329
7	30	25	5	17%	1,3
8	30	27	3	10%	1,235
9	30	26	4	13%	1,217
10	30	25	5	17%	1,312
				%Total=13%	
Série E3xE6 INTRA					
1	30	27	3	10%	0,906
2	30	28	2	7%	0,953
3	30	29	1	3%	0,958
4	30	28	2	7%	0,978
5	30	28	2	7%	1,006
6	30	27	3	10%	0,992
7	30	27	3	10%	0,852
8	30	27	3	10%	0,977
9	30	28	2	7%	0,932
10	30	27	3	10%	0,898
				%Total=8%	
Série G2xG5 INTRA					
1	30	23	7	23%	0,75
2	30	27	3	10%	0,781
3	30	26	4	13%	0,717
4	30	22	8	27%	0,723
5	30	27	3	10%	0,816
6	30	26	4	13%	0,749
7	30	25	5	17%	0,704
8	30	26	4	13%	0,757
9	30	26	4	13%	0,705
10	30	24	6	20%	0,885
				%Total=16%	
Série G3xE6 INTRA					
1	30	27	3	10%	2,041
2	30	25	5	17%	1,889
3	30	22	8	27%	1,987
4	30	25	5	17%	1,867
5	30	28	2	7%	1,753
6	30	24	6	20%	1,927
7	30	23	7	23%	2,045
8	30	27	3	10%	1,77
9	30	25	5	17%	1,837
10	30	28	2	7%	1,761
				%Total=15%	

Séries INTER

Animal #	Nº total de mitoses estudadas	Nº total de mitoses 2n=20	Nº total de mitoses aneuploides	% individual de aneuploidia	Peso do animal(g)
Série E2XG5 INTER					
1	30	27	3	10%	1,235
2	30	24	6	20%	1,305
3	30	25	5	17%	1,293
4	30	25	5	17%	1,295
5	30	24	6	20%	1,313
6	30	29	1	3%	1,25
7	30	27	3	10%	1,301
8	30	27	3	10%	1,43
9	30	25	5	17%	1,373
10	30	29	1	3%	1,294
				%Total=13%	
Série E3xE6 INTER					
1	30	28	2	7%	1,266
2	30	27	3	10%	1,116
3	30	27	3	10%	1,185
4	30	27	3	10%	1,093
5	30	27	3	10%	1,225
6	30	27	3	10%	1,129
7	30	28	2	7%	1,118
8	30	26	4	13%	0,987
9	30	29	1	3%	1,068
10	30	28	2	7%	1,08
				%Total=9%	
Série G2xG5 INTER					
2	30	26	4	13%	1,249
3	30	26	4	13%	1,254
4	30	26	4	13%	1,225
5	30	24	6	20%	1,262
6	30	24	6	20%	1,157
7	30	25	5	17%	1,295
8	30	21	9	30%	1,149
9	30	23	7	23%	1,123
10	30	26	4	13%	1,116
11	30	24	6	20%	1,11
				%Total=18%	
Série G3xE6 INTER					
1	30	26	4	13%	1,11
2	30	27	3	10%	1,092
3	30	24	6	20%	1,162
4	30	24	6	20%	1,238
5	30	26	4	13%	1,124
6	30	26	4	13%	1,089
7	30	25	5	17%	1,219
8	30	28	2	7%	1,133
9	30	26	4	13%	1,094
10	30	27	3	10%	1,292
				%Total=14%	

Aneuploidia nas séries inter e intra, de cada cruzamento efectuado para obtenção de G2.

Séries INTRA

Animal #	Nº total de mitoses estudadas	Nº total de mitoses 2n=20	Nº total de mitoses aneuploides	% individual de aneuploidia	Peso médio do animal(g)
Série 10 INTRA					**0.59**
1	30	23	7	23%	
2	30	24	6	20%	
5	30	25	5	17%	
6	30	22	8	27%	
7	30	22	8	27%	
8	30	20	10	33%	
9	30	21	9	30%	
11	30	20	10	33%	
12	30	20	10	33%	
31(H)	30	23	7	23%	
				%Total=26%	
Série 18 INTRA					**0.751**
11	30	25	5	17%	
12	30	25	5	17%	
13	30	29	1	3%	
14	30	24	6	20%	
15	30	26	4	13%	
16	30	22	8	27%	
17	30	26	4	13%	
18	30	26	4	13%	
19	30	24	6	20%	
20	30	27	3	10%	
				%Total=15%	
Série 19 INTRA					**0.906**
11	30	22	8	27%	
12	30	27	3	10%	
13	30	25	5	17%	
14	30	24	6	20%	
15	30	28	2	7%	
16	30	27	3	10%	
17	30	24	6	20%	
18	30	25	5	17%	
19	30	24	6	20%	
20	30	24	6	20%	
				%Total=17%	
Série 3					**1.012**
11	30	27	3	10%	
12	30	24	6	20%	
13	30	25	5	17%	
14	30	23	7	23%	
15	30	26	4	13%	
16	30	26	4	13%	
17	30	26	4	13%	
18	30	28	2	7%	
19	30	29	1	3%	
20	30	24	6	20%	
				%Total=14%	
Série 22 INTRA					**1.222**
21	30	25	5	17%	
22	30	25	5	17%	
23	30	27	3	10%	
27	30	29	1	3%	
25	30	27	3	10%	
26	30	25	5	17%	
30	30	29	1	3%	
				%Total=13%	
Série 24 INTRA					**1.488**
1(H)	30	26	4	13%	
2	30	24	6	20%	
3	30	27	3	10%	
4	30	23	7	23%	
6	30	28	2	7%	
7	30	27	3	10%	
8	30	28	2	7%	
9	30	25	5	17%	
10	30	25	5	17%	
11	30	28	2	7%	
				%Total=13%	

Séries INTER

Animal #	Nº total de mitoses estudadas	Nº total de mitoses 2n=20	Nº total de mitoses aneuploides	% individual de aneuploidia	Peso médio do animal(g)
Série 10 INTER					**0.983**
2	30	23	7	23%	
4	30	24	6	13%	
11	30	23	7	23%	
12	30	21	9	30%	
13	30	23	7	23%	
14	30	23	7	23%	
15	30	23	7	23%	
26	30	23	7	23%	
27	30	19	11	37%	
28	30	21	9	30%	
				%Total 25%	
Série 18 INTER					**0.983**
11	30	25	5	17%	
12	30	29	1	3%	
13	30	24	6	20%	
14	30	26	4	13%	
15	30	25	5	17%	
16	30	26	4	13%	
17	30	24	6	20%	
18	30	25	5	17%	
19	30	22	8	27%	
20	30	26	4	13%	
				%Total=16%	
Série 19 INTER					**0.983**
11	30	26	4	13%	
12	30	22	8	27%	
13	30	29	1	3%	
14	30	25	5	17%	
15	30	28	2	7%	
16	30	27	3	10%	
17	30	24	6	20%	
18	30	23	7	23%	
19	30	23	7	23%	
20	30	27	3	3%	
				%Total=15%	
Série 22 INTER					**0.983**
11	30	28	2	7%	
12	30	27	3	10%	
13	30	27	3	10%	
17	30	29	1	3%	
15	30	27	3	10%	
16	30	25	5	17%	
20	30	28	2	7%	
				%Total=11%	
Série 24 INTER					**0.983**
4	30	27	3	10%	
5(H)	30	27	3	10%	
6	30	26	4	13%	
7	30	23	7	23%	
8	30	26	4	13%	
9	30	25	5	17%	
26(H)	30	27	3	10%	
27(H)	30	27	3	10%	
28	30	26	4	13%	
29	30	24	6	20%	
				%Total=14%	

Errata

Na página 114, na legenda da figura 32, onde se lê (a preto) deve ler-se (a branco) e vice versa.

o texto

06.06.00

BIBLIOTECA
DO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
"ABEL SALAZAR"